

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ENFOQUE DE BIORREFINERÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO  
Y METANO A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS**

**POR**

**SANTIAGO RODRÍGUEZ VALDERRAMA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
PROCESOS SUSTENTABLES**

**JULIO, 2018**

# ENFOQUE DE BIORREFINERÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Aprobación de la tesis

---

Dr. Carlos Escamilla Alvarado  
**Asesor**

---

Dr. Pasiano Rivas García  
**Asesor**

---

Dra. Mónica María Alcalá Rodríguez  
**Comité**

---

Dr. José Julián Cano Gómez  
**Comité**

---

Dr. José Rubén Morones Ramírez  
**Comité**

---

Dr. Jean-Pierre Magnin  
**Comité**

---

Dra. María Araceli Hernández Ramírez  
**Subdirectora de estudios de posgrado**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

Por darme sabiduría para afrontar este nuevo camino

### ***A Jorge y Sara***

Por darme siempre fuerza y amor.

### ***A Manuela y David***

Por confiar en mí y darme ánimos

### ***A Tatiana***

Por enseñarme a ser constante y por su gran amor

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sinceramente al Dr Carlos Escamilla Alvarado por ser un gran padre académico y por enseñarme que todo es posible aun cuando la adversidad está presente.

Al Dr. Pasiano Rivas García, por inculcarme el pensamiento crítico y científico.

A los miembros del comité tutorial por sus aportes en la realización del proyecto.

A la Dra. Leonor Patricia Güereca Hernández, por permitirme adquirir conocimientos relacionados con el Análisis de Ciclo de Vida, durante mi estancia de investigación.

A mis compañeros de generación, por estar siempre atentos al desarrollo del proyecto.

A los estudiantes de servicio social, quienes colaboraron en la fase experimental del proyecto de maestría.

Al CONACYT, por el apoyo de manutención brindado durante el tiempo de estudio.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por las instalaciones que permitieron el desarrollo experimental del proyecto.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	i
LISTA DE ECUACIONES.....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABLAS .....	vi
ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y SUBÍNDICES .....	viii
RESUMEN.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Producción alimentaria y generación de residuos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Biorrefinerías como sistemas de conversión de residuos orgánicos .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. <i>La biomasa como materia prima.....</i>	10
2.2.2. <i>Pretratamientos de la biomasa. ....</i>	11
2.2.3. <i>Fermentación oscura .....</i>	15
2.2.4. <i>Digestión anaerobia.....</i>	19
2.2.5. <i>Fotofermentación.....</i>	22
<b>2.3. Análisis de ciclo de vida .....</b>	<b>26</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1. Plan de trabajo.....</b>	<b>29</b>
<b>5.2. Actividad 1. Caracterización de co-sustratos .....</b>	<b>30</b>
5.2.1. <i>Propósito .....</i>	30
5.2.2. <i>Diseño experimental .....</i>	30
5.2.3. <i>Programa de seguimiento y análisis .....</i>	30
5.2.4. <i>Métodos y procedimientos .....</i>	30
<b>5.3. Actividad 2. Hidrólisis ácida de co-sustratos orgánicos (RM y RVF) .....</b>	<b>32</b>
5.3.1. <i>Propósito .....</i>	32
5.3.2. <i>Diseño experimental.....</i>	33
5.3.3. <i>Programa de seguimiento y análisis .....</i>	33
5.3.4. <i>Métodos y procedimientos.....</i>	35
5.3.5. <i>Escalamiento de la hidrólisis ácida diluida. ....</i>	36
<b>5.4. Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura con hidrolizados ácidos líquidos. ....</b>	<b>36</b>
5.4.1. <i>Propósito .....</i>	36
5.4.2. <i>Diseño experimental .....</i>	36

5.4.3.	<i>Programa de seguimiento y análisis</i>	37
5.4.4.	<i>Métodos y procedimientos</i>	37
5.4.5.	<i>Escalamiento de la fermentación oscura</i>	39
<b>5.5.</b>	<b>Actividad 4. Producción de metano por digestión anaerobia con hidrolizados ácidos sólidos.</b>	40
5.5.1.	<i>Propósito</i>	40
5.5.2.	<i>Diseño experimental</i>	40
5.5.3.	<i>Programa de seguimiento y análisis</i>	40
5.5.4.	<i>Métodos y procedimientos</i>	41
<b>5.6.</b>	<b>Actividad 5. Producción de hidrógeno por fotofermentación a ácidos orgánicos volátiles provenientes de la fermentación oscura</b>	42
5.6.1.	<i>Propósito</i>	42
5.6.2.	<i>Diseño experimental</i>	42
5.6.3.	<i>Programa de seguimiento y análisis</i>	43
5.6.4.	<i>Métodos y procedimientos</i>	44
<b>5.7.</b>	<b>Actividad 6. Análisis ambiental basado en el análisis del ciclo de vida</b>	45
5.7.1.	<i>Propósito</i>	45
5.7.2.	<i>Diseño experimental</i>	45
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	48
6.1.	<b>Actividad 1. Caracterización de los co-sustratos.</b>	48
6.2.	<b>Actividad 2. Hidrólisis ácida de co-sustratos orgánicos (RM y RVF)</b>	52
6.3.	<b>Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura con hidrolizados ácidos líquidos.</b>	62
6.4.	<b>Actividad 4. Producción de metano por digestión anaerobia con hidrolizados ácidos sólidos.</b>	69
6.5.	<b>Actividad 5. Producción de hidrógeno por fotofermentación a ácidos orgánicos volátiles provenientes de la fermentación oscura</b>	72
6.5.1.	<i>Efecto de la intensidad lumínica en el crecimiento microbiano</i>	72
6.6.	<b>Actividades pendientes por realizar</b>	77
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	78
	<b>REFERENCIAS</b>	80
	<b>ANEXOS</b>	94

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modelo de Gompertz modificado para producción de hidrógeno .....	17
Ecuación 2. Modelo modificado de Gompertz para la producción de metano. ....	20
Ecuación 3. Producción de hidrógeno a partir de ácido acético. Requerimiento de energía.....	23
Ecuación 4. Determinación del índice de cristalinidad (ICr).....	32
Ecuación 5. Determinación del peso seco celular (PSC) en bacterias fotofermentativas .....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de biodegradación de la biomasa por fermentación oscura..	16
Figura 2. Bioquímica de la digestión anaerobia.	19
Figura 3. Metabolismo general de generación de hidrógeno en procesos fotofermentativos.	22
Figura 4. Esquema de un ACV.	27
Figura 5. Esquema plan de trabajo.	29
Figura 6. Esquema de biorrefinería para la producción de hidrógeno y metano.	47
Figura 7. Análisis termogravimétrico de co-sustratos	50
Figura 8. Difractogramas de rayos X de los co-sustratos	51
Figura 9. Concentración de azúcares reductores (CAR) con respecto a la relación de combinación RVF:RM para cada ácido catalizador	52
Figura 10. Concentración de azúcares reductores (CAR) por mol de iones hidronio de cada relación de combinación RVF:RM para cada ácido catalizador.	53
Figura 11. Efectos principales en la CAR (a) Relación RVF:RM, (b) tipo de ácido.	54
Figura 12. Efectos principales en la conversión de azúcares reductores (a) Relación RVF:RM, (b) tipo de ácido.	55
Figura 13. Composición de azúcares en los hidrolizados líquidos por HPLC	56
Figura 14. Difractograma de rayos X de los hidrolizados sólidos.	60
Figura 15. Comparación de estabilidad térmica de co-sustratos	61
Figura 16. Producción de hidrógeno acumulado y ajuste de la ecuación de Gompertz modificada con respecto a la concentración de azúcares reductores. (a) CAR=10 g/L, (b) CAR=13 g/L, (c) CAR=16 g/L	64
Figura 17. Volumen acumulado de biogás e hidrógeno en el escalamiento de la FO	68
Figura 18. Producción de metano acumulado a partir de hidrolizados sólidos.	70
Figura 19. Efecto de la intensidad lumínica en el crecimiento de bacterias fotofermentativas.	72
Figura 20. Ensayo presuntivo de producción de hidrógeno por fotofermentación (P1FF/RCVP/AOV-FO)	73



Figura 21. (a) Crecimiento celular y (b) producción de biogás acumulado correspondiente al ensayo presuntivo (P2FF/RCVP/AOV-FO).....	74
Figura 22. Evaluación de la fuente de la concentración de la fuente de nitrógeno en la producción de hidrógeno, ensayo presuntivo (P3FF/RCVP/AOV-FO) .....	76

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de RAL .....	6
Tabla 2. Caracterización de la FORSU .....	7
Tabla 3. Bioenergéticos y bioproductos a partir de residuos orgánicos.....	11
Tabla 4. Pretratamientos de la biomasa para la obtención de azúcares monoméricos. ....	13
Tabla 5. Concentración de inhibidores que afectan el metabolismo microbiano. ....	14
Tabla 6. Fermentación oscura para producción de hidrógeno en diferentes sistemas. ....	18
Tabla 7. Producción de metano a partir de sustratos residuales.....	21
Tabla 8. Producción de hidrógeno por FF a partir de efluentes de FO .....	25
Tabla 9. Parámetros para caracterizar los sustratos .....	30
Tabla 10. Diseño de experimento de hidrólisis ácida .....	33
Tabla 11. Técnicas para la determinación de azúcares en los hidrolizados líquidos .....	34
Tabla 12. Análisis de los hidrolizados sólidos. ....	34
Tabla 13. Diseño experimental fermentación oscura 3 <sup>2</sup> .....	37
Tabla 14. Seguimiento experimental de la fermentación oscura en modo batch .....	37
Tabla 15. Diseño experimental, ensayos de biodegradación anaerobia.....	40
Tabla 16. Seguimiento de la biodegradación anaerobia en modo batch. ....	40
Tabla 17. Diseño experimental, reactivación cepas fotofermentativas .....	42
Tabla 18. Seguimiento reactivación de cepas fotofermentativas y presuntivos de producción de H <sub>2</sub> a partir de AOV. ....	44
Tabla 19. Composición de los RVF .....	48
Tabla 20. Caracterización fisicoquímica de residuos orgánicos .....	48
Tabla 21. Fórmula molecular empírica de co-sustratos.....	49
Tabla 22. Comparación del ICr de diferentes residuos orgánicos .....	51
Tabla 23. Compuestos secundarios de hidrólisis ácida.....	58
Tabla 24. Caracterización de hidrolizados líquidos en el escalamiento de la hidrólisis ácida.....	62
Tabla 25. Constantes de la ecuación de Gompertz del diseño experimenta 3 <sup>2</sup> de FO .....	64
Tabla 26. ANOVA de diseño de experimento 3 <sup>2</sup> de FO.....	64
Tabla 27. Concentración de metabolitos secundarios en la fermentación oscura. ....	66
Tabla 28. Parámetros del modelo de Gompertz y metabolitos secundarios durante el escalamiento de la fermentación oscura.....	66
Tabla 29. Caracterización del inóculo e hidrolizados sólidos .....	69

Tabla 30. Desempeño de la digestión anaerobia y parámetros del modelo de Gompertz modificado. ....	71
Tabla 31. Cronograma de actividades por realizar .....	77

## ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y SUBÍNDICES

AOVs	Ácidos orgánicos volátiles
ANOVA	Análisis de varianza
ACV	Análisis de ciclo de vida
ATG	Análisis termogravimétrico
B <sub>0</sub>	Máximo rendimiento de metano en la fermentación (mL CH <sub>4</sub> /g
SV)	
CAR	Concentración de azúcares reductores (g/L)
DA	Digestión anaerobia
DRX	Difracción de rayos X
Ev	Iluminancia (lx)
FORSU	Fracción orgánica de residuos sólidos urbanos
FF	Fotofermentación
FO	Fermentación oscura
GEI	Gases de efecto invernadero
H <sub>max</sub>	Hidrógeno máximo acumulado (mL)
H(t)	Hidrógeno acumulado con respecto al tiempo (mL)
HMF	5-hidroximetil furfural
ICr	Índice de cristalinidad (%)
NTK	Nitrógeno total
PBM	Potencial de biometanización
PSC	Peso seco celular (g/L)
R <sub>max</sub>	Tasa máxima de producción de hidrógeno (mL/h)
R <sub>m</sub>	Tasa de producción máxima de metano (mL CH <sub>4</sub> /g SV d),
Ref	Referencia
RSU	Residuos sólidos urbanos
RAL	Residuos agrícolas lignocelulósicos
RM	Rastrojo de maíz
RVF	Residuos de vegetales y frutas
ST	Sólidos totales
SV	Sólidos volátiles
t	Tiempo de fermentación (h)
V <sub>o</sub>	Volumen de operación (L)

### Subíndices

bh	Base húmeda
bs	Base seca
λ	Tiempo de la fase lag (h)
Y <sub>H<sub>2</sub></sub>	Rendimiento molar de hidrógeno

## RESUMEN

Santiago Rodríguez Valderrama

Fecha de graduación:

Julio 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de la investigación: ENFOQUE DE BIORREFINERÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO Y METANO A PARTIR DE RESIDUOS ORGÁNICOS

Número de páginas: 101

Candidato para el grado de  
Maestría en  
Ciencias con Orientación en  
Procesos Sustentables

Se realizó el desarrollo experimental de un enfoque de biorrefinería a escala laboratorio para la producción de hidrógeno y metano a partir de la combinación de residuos orgánicos, rastrojo de maíz (RM) y residuos de vegetales y frutas (RVF) como sustratos; estos fueron caracterizados fisicoquímicamente, mostrando un 85% de materia orgánica volátil susceptible de biotransformación. El enfoque de biorrefinería se constituyó de los siguientes procesos: hidrólisis ácida de los co-sustratos, fermentación oscura, fotofermentación y digestión anaerobia. posteriormente una primera etapa de producción de hidrógeno a partir de los hidrolizados líquidos ácidos, posteriormente los fermentados ricos en ácidos orgánicos volátiles –subproducto de la fermentación oscura– son recuperados para la evaluación de la producción de hidrógeno mediante bioprocesos de fotofermentación, en paralelo la biomasa sólida insoluble remanente la hidrólisis ácida fue utilizada como sustrato para bioprocesos de digestión anaerobia para la producción de metano. Cada una de las etapas constituyentes del enfoque de biorrefinería fue evaluada bajo diseño de experimentos para determinar los efectos de factores clave para la operación de los bioprocesos.

En la hidrólisis ácida de los co-sustratos se evaluó la concentración de azúcares reductores y la conversión de azúcares con respecto a la combinación de co-sustratos mediante un diseño de experimentos 5X2. Los efectos principales mostraron que el tipo de ácido catalizador (HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y la combinación tienen efecto significativo en la producción de azúcares reductores. El mejor ácido catalizador y la combinación de co-sustratos fue el HCl y 75:25 RVF:RM, debido a que a mayor concentración de RVF

se incrementa la concentración de azúcares reductores y la mayor disponibilidad de iones hidronio la presentó el HCl. Los principales azúcares monoméricos presentes en los hidrolizados líquidos fueron glucosa, xilosa y arabinosa. Compuestos inhibidores como el furfural, 5-hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos totales fueron detectados en los hidrolizados.

La producción de hidrógeno por fermentación oscura se realizó con un diseño experimental  $3^2$ , con el cual se evaluó la producción de hidrógeno acumulada en botellas serológicas variando la relación inóculo sustrato. La máxima tasa de producción de hidrógeno y la mayor producción acumulada fue 0.34 mmol  $H_2$ /h y 8.08 mmol  $H_2$ , respectivamente, para la RIS de 1.2 a 13 g/L de azúcares reductores como concentración inicial. Los principales metabolitos secundarios presentes en el medio líquido de la fermentación oscura fueron: ácido acético, propiónico butírico y etanol. La producción de metano a partir de los hidrolizados sólidos se realizó en modo lote en botellas serológicas a 35 °C. El mayor rendimiento de metano fue de 17.45 mmol  $CH_4$ /g SV para el control con RVF frescos, mientras que a una RIS de 2.5 se encontró la mayor conversión de hidrolizados sólidos a metano (13.72 mmol  $CH_4$ /g SV).

Se realizó la reactivación de 4 cepas fotofermentativas evaluando el crecimiento con respecto a la intensidad lumínica. Los experimentos presuntivos de producción de hidrógeno a partir de ácidos orgánicos volátiles por fotofermentación tuvieron bajas producciones de hidrógeno comparadas con el medio ideal de fotofermentación RCV.

Se demostró que con la combinación de RM y RVF se puede producir hidrógeno y metano bajo un modelo de biorrefinería, incluyendo etapas de pretratamiento y bioprocesos.

Firma de asesor: \_\_\_\_\_

**Carlos Escamilla Alvarado**

## INTRODUCCIÓN

La demanda energética mundial se suple en su mayoría mediante combustibles de origen fósil. Existe una preocupación por el agotamiento gradual de estos recursos (petróleo, carbón y gas natural) debido al incremento de la población mundial y consecuentemente la demanda energética que crece en promedio 1.4 % anual según estimaciones de la Agencia Internacional de Energía para los años 2008 al 2035 (Aslanzadeh et al., 2014; IEA, 2010). El consumo de este tipo de combustibles ha ocasionado diversos efectos perjudiciales en el medio ambiente como el calentamiento global, contaminación de aire, suelos, aguas subterráneas y superficiales (Asif et al., 2007).

Debido a estas problemáticas ambientales, muchos países han adoptado políticas para producción de energía a partir de fuentes renovables. México en sus responsabilidades ambientales, incluye compromisos de mitigación en cuanto a la reducción de gases de efecto invernadero (GEI) y compuestos de efecto invernadero. Específicamente, para el año 2030, se pretende reducir en un 22% las emisiones de GEI y un 51% las emisiones de contaminantes climáticos de vida corta (Carbono Negro) (Gobierno de México, 2015; Rueda Abad et al., 2016). De las principales propuestas para la obtención de energía a partir de fuentes renovables sin comprometer la seguridad energética, se encuentran la bioenergía, la energía solar, la energía geotérmica, la energía hidroeléctrica, la energía eólica y la energía mareomotriz. Las cuales juegan un papel importante ya que contribuyen en el desarrollo sustentable ayudando en la disminución de GEI en comparadas con otros procesos de producción de energía (IPCC, 2011).

Para el año 2015, la participación de las energías renovables en la matriz energética de México fue del 25.3%. Se estima que para el año 2029, la producción nacional de energía a partir de fuentes renovables sea del 32.94% (SENER, 2015). De las energías renovables, la biomasa se centra como una de las fuentes más prometedoras debido al potencial energético que presenta; en México se podría suplir cerca del 46% de la producción anual de energía a partir de la biomasa, pero actualmente se suple el 5% (IEA, 2016). Algunas tecnologías que se encargan en la transformación de la biomasa en biocombustibles se enfocan en procesos de base biológica, aprovechando el potencial energético presente en la biomasa (Moncada et al., 2016; REMBIO, 2011).

Esta biomasa es abundante y se puede ser constitutiva de materia viva, materia no viva y residuos provenientes de actividades humanas. Estos residuos se pueden clasificar por su origen: residuos forestales, residuos agrícolas, residuos agroindustriales y la fracción biodegradable de residuos sólidos municipales (K. Li et al., 2016). En el sector agrícola se generan residuos orgánicos de frutas (limón, peras, manzanas, papaya, naranja, piña y vegetales, etc) y lignocelulósicos de post-cosecha como la paja de arroz, paja de trigo, paja de avena, bagazo de agave, etc (González-Sánchez et al., 2015; Urbaniec et al., 2015). Los residuos agroindustriales tienen características variantes que dependen de la materia prima y de su procesamiento; en general se constituyen por cáscaras de frutas y vegetales procesados, bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz, los cuales tienen potencial para ser reutilizados como materia prima en la producción de productos de valor agregado (Saval, 2012). En las áreas municipales se generan diversidad de residuos que pueden ser aprovechados, estos se constituyen por aguas residuales municipales y la fracción orgánica de los residuos sólidos. La fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos (FORSU) está compuesta por desechos de comida (pre-cocción y post-cocción) generados en restaurantes, caferías, comedores, hoteles y casas, así como otros residuos como papel, cartón, etc (Di Maria et al., 2012; Lee et al., 2014; Urbaniec et al., 2015).

Los residuos orgánicos están compuestos en general por macromoléculas como de carbohidratos, lípidos y proteínas; mientras que como residuos lignocelulósicos se consideran los que tienen un alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (Hernández et al., 2014). Esta composición hace que los residuos orgánicos sean utilizables para la generación de diversos bioproductos, entre los que encontramos a los bioenergéticos, que suplen las necesidades energéticas a partir de fuentes renovables, como el bioetanol, biohidrógeno, biobutanol y metano (Gonzales, Sivagurunathan & Kim, 2016; Khan et al., 2016). A su vez, es posible utilizar estos residuos para producir otro tipo de bioproductos: las enzimas, como las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y pectinasas, que tienen una amplia gama de aplicaciones industriales (Escamilla-Alvarado et al., 2016; Poggi-varaldo, 2016; Saval et al, 2012).

Los macropolímeros presentes en los residuos pueden ser fraccionados en sus diferentes monómeros (azúcares fermentables) como: glucosa y xilosa entre otros para su posterior degradación mediante procesos fermentativos (Azman et al., 2016; Nissilä et al., 2014). Entre los principales pretratamientos se encuentran: el pretratamiento



mecánico, pretratamiento térmico, pretratamiento con vapor de agua, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento alcalino y pretratamiento ácido (Bundhoo et al., 2015; Cortes, 2014), siendo la hidrólisis ácida, el pretratamiento con la mayor eficiencia en la liberación de azúcares fermentables (Arreola-Vargas et al., 2015; Azman et al., 2016;).

Bioenergéticos como el metano y el hidrógeno pueden ser obtenidos a partir de la biodegradación de los azúcares fermentables. Bioprocesos como la digestión anaerobia (DA), la fermentación oscura (FO) y la fotofermentación (FF) se han posicionado como tecnologías eficientes en la producción de metano e hidrógeno respectivamente a partir de residuos orgánicos (Keskin et al., 2011; Poggi-Varaldo et al., 2014; Uçkun et al., 2014; Urbaniec et al., 2015). El estudio de estos bioprocesos es extenso y variable. Por lo general, se basa en el estudio a diferentes regímenes de alimentación (batch, semi-continuo y continuo)(Keskin et al., 2011), modificación de las diferentes variables de operación (temperatura, pH, agitación, ausencia de oxígeno, presencia de luz) (Ghimire,et al., 2015; Mao et al., 2015), diferentes microorganismos (consorcios microbianos, cultivos axénicos) (Mao et al., 2015). La integración de estas operaciones con sus variantes y equipos, en la producción biocombustibles, energía y bioproductos a partir de biomasa se asocia al concepto de biorrefinería (Moncada et al. 2016).

El concepto de biorrefinería es análogo al de refinería de petróleo; esta involucra diferentes operaciones unitarias para obtener diferentes productos, con la diferencia de que en lugar de petróleo se utiliza biomasa como principal fuente de materia prima (Escamilla-Alvarado et al., 2016; Haikonen et al., 2013; Moncada et al., 2016). Un modelo de biorrefinería se acopla a las características de la biomasa para seleccionar las diferentes operaciones unitarias y obtener numerosos productos con gran valor comercial y con una generación mínima de residuos (Moncada et al., 2016; Venkata Mohan et al., 2016). Una biorrefinería puede operar usando como sustrato diferentes tipos de residuos, como la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y los residuos agrícolas lignocelulósicos(Poggi-varaldo et al., 2014). Ésta puede constar de diferentes etapas como la hidrólisis ácida para el fraccionamiento de la biomasa en azúcares fermentables (Narron et al., 2016), fermentación para la producción de bioetanol (Giuliano et al., 2016), digestión anaerobia para la producción de metano (Arreola-Vargas et al., 2015), fermentación oscura para la producción de hidrógeno (Ghimire,et al., 2015), transesterificación de aceites para la producción de

biodiésel y fotofermentación para la generación de hidrógeno (Sagnak et al., 2011; Xia et al., 2013).

Por medio de un análisis técnico-económico y la evaluación de impactos ambientales, se puede identificar las tecnologías más prometedoras en la implementación de una biorrefinería. Por lo anterior el análisis de ciclo de vida (ACV) es una metodología para la evaluación de impactos ambientales y consumo de recursos durante la prestación de servicios o la generación de productos (ISO, 2006b; Tobergte et al., 2013). Por medio del ACV, la producción de bioenergéticos mediante enfoque de biorrefinería puede ser comparada con procesos convencionales de producción de energéticos para determinar los impactos ambientales, el rendimiento económico y energético de las biorrefinerías (Escamilla-Alvarado et al., 2016; Poggi-Varaldo et al., 2014).

En esta investigación, se implementará un modelo de biorrefinería a partir de la combinación de dos residuos orgánicos generados en el territorio mexicano (RM y RVF), evaluando el efecto de la concentración de estos co-sustratos en la hidrólisis ácida diluida como etapa de pretratamiento y la producción en serie de hidrógeno por fermentación oscura y fotofermentación a partir de los hidrolizados líquidos y la producción de metano a partir de los hidrolizados sólidos. Utilizando la metodología del ACV, se evaluarán los impactos ambientales obteniendo el rendimiento energético del modelo de biorrefinería comparándolo con un proceso de digestión anaerobia convencional.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Producción alimentaria y generación de residuos.**

El principal proveedor de alimentos a nivel mundial es el sector agrícola. Con el crecimiento exponencial de la población, este sector debe aumentar la generación de comida en un 60% para poder abastecer la población mundial para el año 2050 (Naciones Unidas, 2015). Consecuentemente a la producción de comida, está la generación de residuos, que está por encima de los 1300 millones de toneladas a nivel mundial, esta cifra aumentará en un porcentaje similar a la producción alimenticia (FAO, 2012). En este sector se generan residuos orgánicos que provienen de cultivos frutales como los cítricos (limón, naranja, tangelo, mandarina), cultivos de peras, manzanas, papaya, naranja, piña y vegetales. Y cultivos con materia orgánica lignocelulósica post-cosecha como la paja de arroz, paja de trigo, paja de avena, bagazo de agave entre otros (González-Sánchez et al., 2015).

En México la mayor producción de residuos agrícolas lignocelulósicos (RAL) se obtiene del cultivo de cereales, entre los principales están: el maíz, el sorgo, el trigo, la cebada. Para el año 2015, la producción de maíz en el país fue de 24.69 millones de toneladas, siendo el maíz blanco el de mayor producción ya que abarca un 85.9% de la producción nacional. De esta producción anual, se estima que la generación de residuos primarios sea 1.5 veces la producción del grano, de acuerdo con lo anterior, la producción de rastrojo de maíz (RM) para el año 2015 fue de 37.035 millones de toneladas (FIRA, 2016; Valdez-Vazquez et al., 2010). Las actividades agrícolas en el estado de Nuevo León se centran en la producción de pastos, maíz, trigo, sorgo, cítricos, nopal y papa. La producción de grano de maíz para el año 2009 en el estado fue de 35,847 toneladas, valor que se incrementó para el año 2014 siendo la producción del estado de 85,418 toneladas (INEGI, 2014; SAGARPA, 2013). Si bien, Nuevo León no es de los principales productores de maíz a nivel nacional, la generación de RM es abundante y se acerca a las 129 mil toneladas anuales (FIRA, 2016).

Parte del RM generado es incinerado, lo cual genera contaminación ambiental por los gases de efecto invernadero por los gases producidos, y otros son dispuestos para alimentación de ganado. Además de los grandes volúmenes de generación, otra razón por la que los RAL pueden ser una importante fuente de energía renovable es debido a su contenido de carbohidratos estructurales, específicamente celulosa y

lignina (Poggi-Varaldo et al., 2014). En la Tabla 1 se muestra la composición de los RAL más importantes, que han sido usados como sustratos para producir bioenergéticos y bioproductos y, su contenido de carbohidratos.

**Tabla 1. Composición de RAL.**

<b>Residuo</b>	<b>Hexosas</b>	<b>Pentosas</b>	<b>Lignina</b>	<b>Ref</b>
<b>Rastrojo de maíz</b>	35.1% glucano	20.6% xilano	14.5% lignina	1
<b>Rastrojo de maíz</b>	23.93% celulosa	16.82% xilano	13.82% lignina	2
<b>Rastrojo de maíz</b>	40.3% glucano	18.6% xilano	19.1% lignina	3
<b>Rastrojo de maíz verde</b>	39.8% celulosa	31.8% hemicelulosa	14.1% lignina	4
<b>Cascarilla de arroz</b>	40.26% glucano	12.12% xilano	25.40% lignina	5
<b>Paja de arroz</b>	33.1% celulosa	26.7% hemicelulosa	NR	6
<b>Paja de trigo</b>	42% celulosa	22% xilano	22% lignina	7

Referencia: 1, Min et al. (2016); 2, H. Li et al. (2013); 3, G. Cao et al. (2009); 4, D. Li et al. (2016); 5, Gonzales et al. (2016); 6, Chang et al. (2011a); 7, Borrión et al. (2012).

Nota: NR: No reportado.

Aparte de los RAL, otros alimentos primarios se desperdician a lo largo de la cadena de suministro, que abarca desde la producción agrícola hasta el consumo final en el hogar. En la producción agrícola se tienen pérdidas por daños mecánicos y/o derrames durante la recolección de los frutos. En el manejo post-cosecha y almacenamiento se tienen pérdidas por el rápido deterioro de los productos durante el su transporte y almacenamiento no adecuado. Las siguientes etapas en la cadena alimenticia donde se producen más residuos equivalen al procesamiento de los productos, distribución y finalmente las pérdidas durante el consumo en los hogares (FAO, 2012; Girotto et al., 2015). En el caso de México, se generan cerca de 76 millones de toneladas de residuos orgánicos por año (González-Sánchez et al., 2015). Estas pérdidas de alimentos conllevan al desperdicio de recursos utilizados en la producción como tierra, agua, energía e insumos y el impacto ambiental por su incorrecta gestión (Sermanat, 2015).

Los residuos sólidos urbanos (RSU) son todos aquellos desechos que provienen de la actividad humana en los asentamientos urbanos. De los residuos (RSU) generados, cerca del 53% corresponde a la fracción orgánica, residuos de papel y similares corresponden al 14%, los plásticos 11%, vidrios 6%, metales 3% y otros

cerca del 13%. La FORSU es la que, como su nombre lo indica, está constituida por residuos orgánicos, típicamente desechos de comida, de jardinería, papel y cartón (Lee et al., 2014; Poggi-Varaldo et al., 1997), llegando a constituir 60% de los RSU. A través de los años se ha propuesto diversas estrategias para reducir el impacto ambiental generado por la disposición final de estos residuos. Estas estrategias van desde la oxidación de la materia orgánica con métodos aerobios (compostaje), bioprocesos (digestión anaerobia, fermentación oscura) hasta métodos poco eficientes y poco controlados como lo es la disposición en rellenos sanitarios (Di Maria et al., 2012). De acuerdo con su composición, la FORSU representa una fuente importante de energía renovable, la cual puede contribuir a la reducción en el consumo de combustibles fósiles y al impacto ambiental generado por su mal manejo (Campuzano et al., 2016). En la Tabla 2 se pueden ver algunas investigaciones que utilizan la FORSU como sustrato para la producción de diferentes bioproductos o bioenergéticos.

**Tabla 2. Caracterización de la FORSU**

<b>Residuo</b>	<b>pH</b>	<b>%ST<sup>a</sup></b>	<b>%SV<sup>b</sup></b>	<b>Nitrógeno</b>	<b>Alcalinidad</b>	<b>Ref</b>
<b>FORSU</b>	6.51	82.34	29.89	10.93 <sup>c</sup>	14 <sup>d</sup>	1
<b>FORSU</b>	5.54	23.26	83.29	324.45 <sup>c</sup>	4447.06 <sup>d</sup>	2
<b>FORSU</b>	6.66	20.9	87.5	NR	625 <sup>e</sup>	3
<b>Residuos de comida</b>	4.96	24.75	92.88	340.48 <sup>c</sup>	NR	4
<b>Vegetales</b>	NR	19	89	25.3 <sup>f</sup>	NR	5
<b>Residuos de cafetería</b>	11.8	4.6	95.65	1.1 <sup>g</sup>	4.8 <sup>d</sup>	6

Referencia: 1, Fernández-Rodríguez et al. (2013); 2, Parra et al. (2014); 3, Escamilla-Alvarado et al. (2013); 4, Tampio et al. (2014); 5, Alibardi et al. (2015); 6, Kim et al. (2008).

Nota: <sup>a</sup>ST: Sólidos totales en base húmeda(bh); <sup>b</sup>SV: Sólidos volátiles en base seca(bs); NR: no reportado; <sup>c</sup> Nitrógeno amoniacal [mg NH<sub>3</sub>-N/L]; <sup>d</sup> mg CaCO<sub>3</sub>/L; <sup>e</sup> mg CaCO<sub>3</sub>/kg bh; <sup>f</sup> Nitrógeno total Kjeldahl [mg N/g bs]; <sup>g</sup> Nitrógeno total Kjeldahl [mg N/L].

El manejo de los residuos sólidos urbanos en México es insuficiente e inadecuado, ya que la mayoría de los municipios no cuenta con la infraestructura para la recolección y la disposición final de los residuos. Estos residuos se depositan generalmente en rellenos sanitarios, que cada vez tienen menos capacidad y se encuentran abiertos al ambiente (Sermanat, 2015). Existen varias consecuencias

causadas por la masiva generación de residuos sólidos tanto urbanos como rurales y sus sistemas de gestión que van desde elevados costos de recolección, contaminación durante el transporte, alto volumen de materia sólida, falta de espacio en rellenos sanitarios, gestión inadecuada, generación de gases de efecto invernadero, generación de malos olores, lixiviados contaminantes de aguas subterráneas y acumulación de fauna nociva (cucarachas, ratones, mosquitos, etc.)(Sol et al., 2013).

La falta de planificación en cuanto al tratamiento de estos residuos y su abundante generación hace que se implementen métodos de disposición final rápidos como los rellenos sanitarios. Actualmente una persona desecha en promedio 905 g de residuos sólidos al día, siendo la producción de residuos sólidos per cápita diarios de casi 5 mil toneladas tan sólo en Nuevo León. Razones por las cuales se pretende implementar estrategias de manejo y gestión sustentables de los RSU y el aprovechamiento de la FORSU en la generación de energía (Sermanat, 2015) .

## **2.2. Biorrefinerías como sistemas de conversión de residuos orgánicos**

El uso integrado de la biomasa y su conversión en productos con diferentes usos, se asocia al concepto de biorrefinería, en términos más generales, una biorrefinería implica la conversión total de la materia orgánica en productos con valor agregado, ya sea energético, químico o económico (Moncada et al., 2016). En una biorrefinería se pueden tener diferentes operaciones unitarias ya que tienen un funcionamiento similar a una refinería de petróleo, con la diferencia que se degrada residuos orgánicos en lugar de crudo (Morais et al., 2013).

Las biorrefinerías se basan en dos principios fundamentales: el principio de sustentabilidad y los principios de cascada. El principio de sustentabilidad va de la mano con el respeto hacia el medio ambiente; siendo estos los pilares del desarrollo y el progreso actual, haciendo de los procesos productivos menos contaminantes. Los principios de cascada consisten en el aprovechamiento general de la biomasa en la generación de bioproductos de valor agregado con máximos rendimientos y mayores ganancias (Poggi-Varaldo et al., 2014). Dependiendo de interés particular, la biorrefinería se puede regir bajo el principio de cascada directa o cascada inversa; siendo la producción principal de bioproductos y la producción de energía a partir de la recuperación de residuos el enfoque del principio de cascada directa. Al contrario, el principio de cascada inversa se enfoca en obtener bioenergéticos como productos

principales (metano, biohidrógeno, bioetanol) y convertir los residuos en otros bioproductos (Escamilla-alvarado et al., 2016).

Existen diferentes modelos de biorrefinerías, estos se acoplan a las características de la biomasa para seleccionar las diferentes operaciones unitarias y obtener numerosos productos con una generación mínima de residuos (Moncada et al., 2016). Debido a esta diversidad, se pueden encontrar diferentes modelos en la literatura. Giuliano et al. (2016) propusieron un modelo de biorrefinería para la generación en serie de etanol, ácido succínico y ácido levulínico a partir de residuos de eucalipto, paja de trigo, con una etapa de tratamiento termoquímico adicional para los residuos no aprovechables mediante procesos de fermentación. Escamilla-alvarado et al. (2015), aprovecharon la FORSU para producir hidrógeno, y aprovechar los efluentes de la producción de hidrógeno para producir metano y enzimas, bajo un modelo de biorrefinería, mediante el principio de cascada inversa.

Por otro lado, Jyoti et al. (2015) aprovechan los residuos de la producción de hidrogeno por fermentación oscura, para recuperar etanol, ácido butírico, 1-3-propanediol, producir metano, hidrógeno y bioplásticos. Otros bioenergéticos como el biodiesel, también son producidos en biorrefinerías; González et al., (2015) estudiaron el potencial de producción de biodiesel con microalgas marinas bajo un modelo de biorrefinería y Almeida et al.. (2012) evaluaron el potencial del glicerol como subproducto del biodiesel para la generación de diversos productos mediante un modelo de biorrefinería con procesos fermentativos. Las biorrefinerías anaeróbicas le han dado un nuevo enfoque a la fabricación de productos con base biológica, involucrando diversidad de residuos como materia prima y su conversión en bioenergéticos, bioproductos, calor y energía eléctrica (Sawatdeenarunat et al., 2016).

Simplistamente, las biorrefinerías por lo general están estructuradas de la siguiente forma: *i)* la sección de pretratamiento para fraccionar la biomasa, haciéndola más asimilable por los bioprocesos corriente abajo, *ii)* la sección del bioprocesos (fermentación, digestión) en la cual los compuestos obtenidos del pretratamiento son convertidos en los diferentes bioproductos, y *iii)* la tercera sección corresponde a la purificación de los bioproductos ya que pueden contener impurezas generadas por la naturaleza de las reacciones. Por último la sección de conversión energética, en la cual algunos residuos y bioproductos son utilizados para generar electricidad (Giuliano et al., 2016).

Un modelo de biorrefinería que, de acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada aún no ha sido ensayado, podría utilizar como sustratos la FORSU urbanos y el RM, comprendiendo su hidrólisis ácida como etapa de pretratamiento para la generación de azúcares fermentables, digestión anaerobia para la producción de metano a partir de hidrolizados sólidos, fermentación oscura para la producción de hidrógeno a partir de azúcares fermentables y fotofermentación para la generación de hidrógeno a partir de residuos de fermentación oscura.

#### *2.2.1. La biomasa como materia prima.*

Carbohidratos, lípidos y proteínas son las tres principales macromoléculas que componen los residuos orgánicos. La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas. Esta biomasa es producida por medio de la fotosíntesis, convirtiéndose así, en la fuente de carbono renovable más abundante en el mundo (Castillo et al., 2012). En general, tanto la FORSU como los RA tienen un buen potencial energético y un alto contenido de materia orgánica, que puede ser transformada mediante diferentes bioprocesos en biocombustibles (Hui Li et al., 2016).

Las investigaciones se centran principalmente en la producción de biocombustibles, como el bioetanol, biodiesel, biohidrógeno, biogás (Saval, 2012), los cuales pueden ser utilizados en la generación de electricidad, calor, combustión vehicular entre otros. Estos beneficios energéticos ya han sido utilizados alrededor del mundo, por ejemplo: en Italia, 3406 GW h de electricidad fue producida de biogás con alto contenido de metano en el 2011, en Alemania, cerca de 4000 agricultores poseen unidades productoras de biogás y China posee cerca de 26.5 millones de plantas de biogás las cuales fueron construidas para el año 2007, con una capacidad de almacenamiento de 10.5 billones de m<sup>3</sup> (Mao et al., 2015).

Otro bioenergético que se puede obtener a partir de la degradación biológica de los residuos orgánicos es el biohidrógeno, el cual es conocido como el combustible del futuro (Xia et al., 2013), ya que durante su combustión solo se genera vapor de agua y energía (Blanco et al., 2012). Actualmente, el hidrógeno es producido por pirólisis de combustibles fósiles, pirólisis y gasificación de biomasa lignocelulósica o electrólisis, pero también puede ser producido por medios biológicos, como la fermentación oscura, la fotofermentación o celdas microbianas (Nissilä et al., 2014). En la Tabla 3 se pueden observar los diferentes bioenergéticos y bioproductos obtenidos a partir de la FORSU y de RAL



**Tabla 3. Bioenergéticos y bioproductos a partir de residuos orgánicos.**

Residuo	Bioenergético y/o bioproducto	Bioproceso	Ref
FORSU líquida y FORSU sólida	Metano	Digestión anaerobia	1
Rastrojo de maíz	Metano	Digestión anaerobia	2
Paja de trigo, granos de maíz, estiércol de vaca, grasa.	Metano	Digestión anaerobia	3
Residuos de cafetería	Hidrógeno	Fermentación oscura	4
Rastrojo de maíz	Hidrógeno	Fermentación oscura	5
Rastrojo de maíz	Hidrógeno	Hidrólisis enzimática, fermentación de lípidos, fotofermentación	6
Residuos de comida	Hidrógeno, metano	Digestión anaerobia, fermentación oscura, fotofermentación	7

Referencia: 1, Fantozzi et al. (2011); 2, Shi et al. (2014); 3, Moset et al. (2015); 4, Lee et al. (2014); 5, Datar et al. (2007); 6, Z. Zhu et al. (2010); 7, Ghimire et al. (2015).

### 2.2.2. Pretratamientos de la biomasa.

La materia prima de las biorrefinerías puede ser expuesta a diferentes tipos de pretratamientos para reducir los macropolímeros en sus monómeros correspondientes y así poder ser degradados mediante procesos de bioconversión. Entre los principales pretratamientos de la biomasa encontramos: el fraccionamiento mecánico, pretratamiento con agua caliente, pretratamiento con líquidos iónicos, hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática, explosión con amonio, pretratamiento con solventes orgánicos entre otros (Bundhoo et al., 2015; Giuliano et al., 2016).

El pretratamiento con mayor con la mayor eficiencia en la liberación de azúcares fermentables es la hidrólisis ácida (Arreola-Vargas et al., 2015; Azman et al., 2016; Gonzales et al., 2016). En ella se utilizan altas temperaturas y ácidos fuertes diluidos o concentrados para hidrolizar las macromoléculas como la celulosa y la hemicelulosa en azúcares monoméricos como la glucosa, xilosa entre otros (Brown et al., 2014). La celulosa es un polisacárido lineal compuesto por miles de moléculas de glucosa (hexosas) las cuales están unidas por el enlace  $\beta$ -1,4—glucosídico (Huang et al., 2013), mientras que la hemicelulosa contiene ramificaciones laterales cortas con

otros monosacáridos; específicamente, la hemicelulosa contiene monosacáridos que incluyen hexosas, pentosas y ácidos urónicos, los cuales están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4—glucosídicos y  $\beta$ -1,3—glucosídicos (Bujang et al., 2013). Los protones presentes en la solución ácida, actúan como catalizadores, los cuales rompen los enlaces glucosídicos que unen los azúcares monoméricos (González-García et al., 2015; Y. Li et al., 2016).

El estudio de la Hidrólisis ácida se ha enfocado en incrementar los rendimientos de azúcares monoméricos obtenidos con respecto a los azúcares disponibles. Para dar pie al aumento de los rendimientos, variables operacionales de hidrólisis se han modificado para incrementar estos rendimientos. Entre las principales variables de operación en procesos de hidrólisis ácida tenemos: El tipo y la concentración de ácido catalizador, temperatura de operación, tiempo de hidrólisis, relación de carga sólido-líquido (Nissila et al., 2014a). La Tabla 4 se enfoca en describir investigaciones con pretratamientos ácidos para la obtención de azúcares fermentables a partir de RAL y RVF.

**Tabla 4. Pretratamientos de la biomasa para la obtención de azúcares monoméricos.**

Residuo	Pretratamiento	Variables de operación	Azúcares monoméricos	Ref
Rastrojo de maíz	Hidrólisis ácida diluida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	CA: 1 % p/p RSL: 1:10 T: 120 °C t: 40 min	G: 1.82 <sup>a</sup> X: 20.44 <sup>a</sup> A: 1.86 <sup>a</sup>	1
Rastrojo de maíz	Hidrólisis ácida diluida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	CA: 1.69% p/p RSL: 1:10 T: 121 °C t: 117 min	G:1.85 [g/L] X: 9.11 [g/L] A: 0.88 [g/L]	2
Rastrojo de maíz	Explosión de vapor	T: 220 °C t: 3 min	G:2.28 [g/L] X: 20.87 [g/L] A: 1.97 [g/L]	3
Bagazo de caña de azúcar	Hidrólisis alcalina (NaOH)	CB: 5 % p/v RSL: 1:15 T: 121 °C t: 60 min	G:0.84 [g/L] X: 0.15 [g/L] A: 1.00 [g/L]	4
Paja de arroz	Hidrólisis ácida (HCl)	RABA: 100:30:0.9 T: 150 °C t: 60 min	G:0.66 [g/L] X: 37.26 [g/L] A: 5.97 [g/L]	5
RVF	Hidrólisis ácida (HCl)	CA: 2 M RSL: 250 <sup>c</sup> T: 28 °C t: 24 h	36 <sup>b</sup>	6
RVF	Hidrólisis ácida diluida (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	CA: 0.5 % RSL: 5% T: 110 °C t: 5 min	50.20 <sup>d</sup>	7

Referencias: 1, Zu et al. (2014); 2, G. Cao et al. (2009); 3, Datar et al. (2007); 4, Fangkum et al. (2011); 5, Chang et al. (2011b); 6, Razaghi et al. (2016); 7, Del Campo et al. (2006).

Nota: CA: Concentración del ácido; CB: Concentración de la base; RSL: Relación sólido-líquido; RABA: Relación agua:biomasa:ácido; T: temperatura de reacción; t: tiempo de reacción; G: Glucosa; X: Xilosa; A: Arabinosa; <sup>a</sup> g de azúcar/100 g de biomasa; <sup>b</sup> mg equivalentes de glucosa/ g biomasa; <sup>c</sup> Gramos de biomasa/L; <sup>d</sup> [g<sub>azúcar</sub>/g<sub>biomasa</sub>] RVF: Residuos de frutas y verduras;

Generalmente existen dos tipos de hidrólisis ácida: hidrólisis ácida diluida e hidrólisis ácida concentrada; se diferencian entre si por las concentraciones de los ácidos catalizadores. Concentraciones ≤10% (p/p) para la hidrólisis ácida diluida y concentraciones > 10% (p/p) para hidrólisis ácida concentrada (S. Kumar et al., 2015).

Sin embargo, se ha encontrado en pretratamientos de hidrólisis ácida concentrada la formación de diferentes compuestos como el 5-hidroximetil furfural (HMF), furfural, ácido acético, ácido levulínico y algunos compuestos fenólicos; los cuales pueden afectar significativamente los procesos de fermentación posteriores (Ávila-lara et al., 2015; Y. Zhang et al., 2012).

Estos compuestos inhibitorios se generan en la descomposición de los azúcares (hexosas y pentosas) obtenidos en la hidrólisis ácida. Específicamente HMF y el furfural se forman de la descomposición de la glucosa y la xilosa respectivamente. Se ha reportado su presencia en procesos fermentativos afecta el crecimiento de los microorganismos ya que reduce la actividad enzimática y actividades biológicas, rompiendo el ADN (ácido desoxirribonucleico) e inhibiendo la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) y proteínas (Argun et al., 2016; Liu et al., 2004). Otro inhibidor como el ácido acético el cual es liberado por los grupos acetil presentes en la hemicelulosa, puede inhibir el crecimiento de los microorganismos, ya que puede traspasar la membrana celular y disminuir el pH intracelular, afectando el metabolismo microbiano (Nissila et al., 2014b). En la Tabla 5 se mencionan algunas concentraciones de inhibidores en las que se reporta inhibición microbiana.

**Tabla 5. Concentración de inhibidores que afectan el metabolismo microbiano.**

Bioproceso	HMF [g/L]	Furfural [g/L]	Compuestos fenólicos [g/L]	Ácido acético [g/L]	Ref
Fermentación oscura	0.86	3.41	NR	NR	1
Fermentación oscura	0.558	0.044	NR	7.806	2
Fermentación oscura	0.13	1.15	0.020	0.6	3
Digestión anaerobia	NR	NR	1.0	NR	4
Fermentación oscura	1.89	1.44	2.282	NR	5
Fermentación oscura	0.8	0.8	0.8	NR	6

Referencia: 1, Rolly et al. (2016); 2, Datar et al. (2007); 3, Monlau et al. (2013); 4, Hierholtzer et al. (2013); 5, Lin et al. (2015); 6, G. Cao et al, (2010).

Nota: NR: No reportado

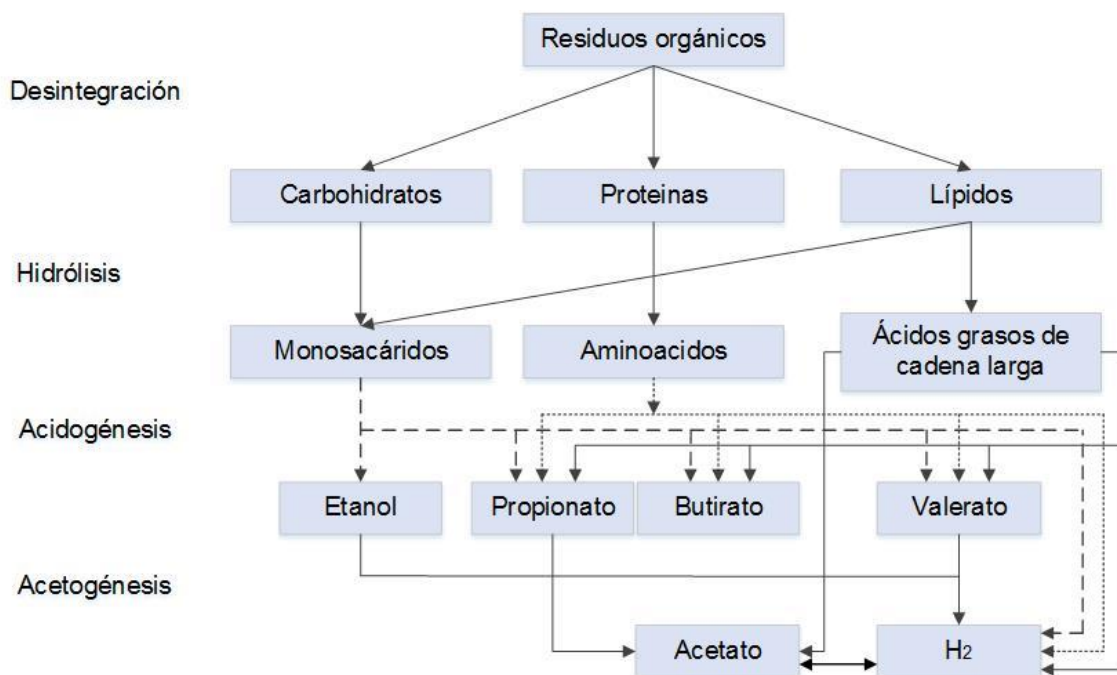
Varios pretratamientos han sido evaluados para reducir las concentraciones de compuestos inhibitorios en hidrolizados ácidos de RAL y FORSU. La precipitación de estos compuestos por la adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  es el tratamiento más común y económico en el tratamiento de hidrolizados ácidos (Overliming) (Martínez et al., 2000; Singh et al., 2013). También se han encontrado estudios en los que se aumenta la remoción de estos compuestos usando tratamientos combinados como: Overliming-carbón activado (Chang et al., 2011a), Overliming- bio-detoxificación fúngica (Saha et al., 2008), pero aumentan los costos de producción de producción de azúcares fermentables (Avci et al., 2013).

### 2.2.3. Fermentación oscura

Uno de los procesos para obtener biohidrógeno a partir de residuos orgánicos es la fermentación oscura (FO). En ella diferentes tipos de microorganismos que crecen en sustratos ricos en carbohidratos (Glucosa, xilosa, almidón, celulosa), degradan la materia orgánica en ácidos y alcoholes con la liberación simultánea de hidrógeno molecular (Blanco et al., 2013). La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura puede ser llevada a cabo por diferentes microorganismos que actúan en ambientes anaerobios o en algunos casos con pequeñas concentraciones de oxígeno en rangos de temperaturas mesófilas, termófilas e hipertermófilas (Blanco et al., 2012). Los principales grupos de microorganismos generadores de hidrógeno son *Enterobacter sp*, *Bacillus sp* y *Clostridium*, también algunas bacterias termofílicas y acidogénicas anaerobias provenientes de lodos (Sagnak et al., 2011). La producción de hidrógeno por medio de la FO tiene tres etapas como se muestra en la Figura 1. La hidrólisis de los carbohidratos, lípidos y proteínas, seguida de la formación de ácidos y alcoholes y finalmente la acetogénesis donde se produce hidrógeno y acetato.

La producción de hidrógeno mediante fermentación oscura puede ser afectada por varios factores, los cuales se asocian a condiciones ambientales, operacionales y químicas. En este sentido, el tipo de inóculo, la concentración de sustrato, concentración de inhibidores, la temperatura y el pH de operación juegan un papel importante en la producción de hidrógeno mediante FO (Castelló et al., 2012). El pH juega un papel importante en el desarrollo de la fermentación. Es considerado uno de los más importantes parámetros de operación en procesos de producción de hidrógeno ya que se a valores de pH inferiores a 4, las producciones de hidrógeno son bajas

debido a la formación de metabolitos ácidos y alcohólicos, los cuales pueden penetrar la membrana celular e interferir con actividades metabólicas regulares (Chu et al., 2008; Elbeshbishy et al., 2017). Por tal razón, es importante mantener los valores de pH dentro de rangos óptimos para facilitar la producción de hidrógeno. Ginkel et al. (2001) demostraron que el mejor rango de pH para la producción de hidrógeno a partir de aguas residuales está comprendido entre 5-6, sin embargo, para poder mantener el pH en estos valores se requiere la adición de medios buffer que pueden hacer un poco más costosa la producción de hidrógeno.



**Figura 1. Etapas de biodegradación de la biomasa por fermentación oscura.**

Modificada de (Ghimire et al., 2015).

Otros factores como la presencia de microorganismos consumidores de hidrógeno o microorganismos competitivos también pueden afectar el buen desarrollo de la fermentación oscura. Es el caso de las bacterias ácido lácticas, las cuales compiten con las bacterias productoras de hidrógeno por la fuente de carbono y generan ácido láctico el cual acidifica el medio e inhibe la producción de hidrógeno (Bundhoo et al., 2016). La temperatura también juega un papel importante en la producción biológica de hidrógeno, ya que puede influenciar en la tasa de degradación de los sustratos, en la actividad enzimática y en el metabolismo de los productores de hidrógeno. Cuando la temperatura es extremadamente alta  $> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$  se presenta la inactivación de enzimas de crecimiento y la desnaturalización de las proteínas, excepto

en bacterias hipertermófilas las cuales producen hidrógeno a elevadas temperaturas. Sin embargo, los costos de operación son elevados para mantener la temperatura constante, por lo cual el rango mesófilo (25-40 °C) se presenta como una buena alternativa para la producción de hidrógeno con buenos rendimientos (J. Wang et al., 2008).

Relaciones inóculo sustrato (RIS [ g SV inóculo/ g SV sustrato]) inferiores a 1/6 se han encontrado como RIS de inhibición por sustrato, debido a que con altas concentraciones de sustrato se incrementa inicialmente el tiempo de adaptación de los microorganismos al sustrato así como un incremento en la presión parcial de hidrógeno la cual influye en el cambio del metabolismo (producción de ácidos por producción de solventes) (Nissila et al., 2014a). De acuerdo con esto, se debe optimizar las concentraciones de sustrato inicial para evitar la inhibición por concentraciones de sustrato (Elbeshbishy et al., 2017).

La ecuación de Gompertz modificada de ha sido usada para correlacionar la producción de hidrógeno en modo batch. Esta ecuación está describe el progreso de la fermentación, con esta información se puede determinar los efectos de la concentración de sustrato, concentración de inhibidores, temperaturas, pH (J. Wang et al., 2009). La ecuación 1, representa el modelo de Gompertz modificado, en dónde  $H(t)$  representa el hidrógeno acumulado con respecto al tiempo ( $\text{mL H}_2$ ),  $H_{\max}$  es el valor máximo de hidrógeno acumulado ( $\text{mL}$ ),  $R_{\max}$  es la tasa máxima de producción de hidrógeno ( $\text{mL/h}$ ),  $\lambda$  es la tiempo de la fase lag (h), 'e' es 2.718 y  $t$  es el tiempo de fermentación (h) (Zwietering et al., 1990). En la Tabla 6 se mencionan algunas investigaciones que han usado diferentes fuentes de sustratos para la producción de hidrógeno por medio de la FO, relacionando la RIS, concentración de sustrato, tipo de inóculo y parámetros de la ecuación de Gompertz modificada.

$$H(t) = H_{\max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{\max} \cdot e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

**Ecuación 1. Modelo de Gompertz modificado para producción de hidrógeno**

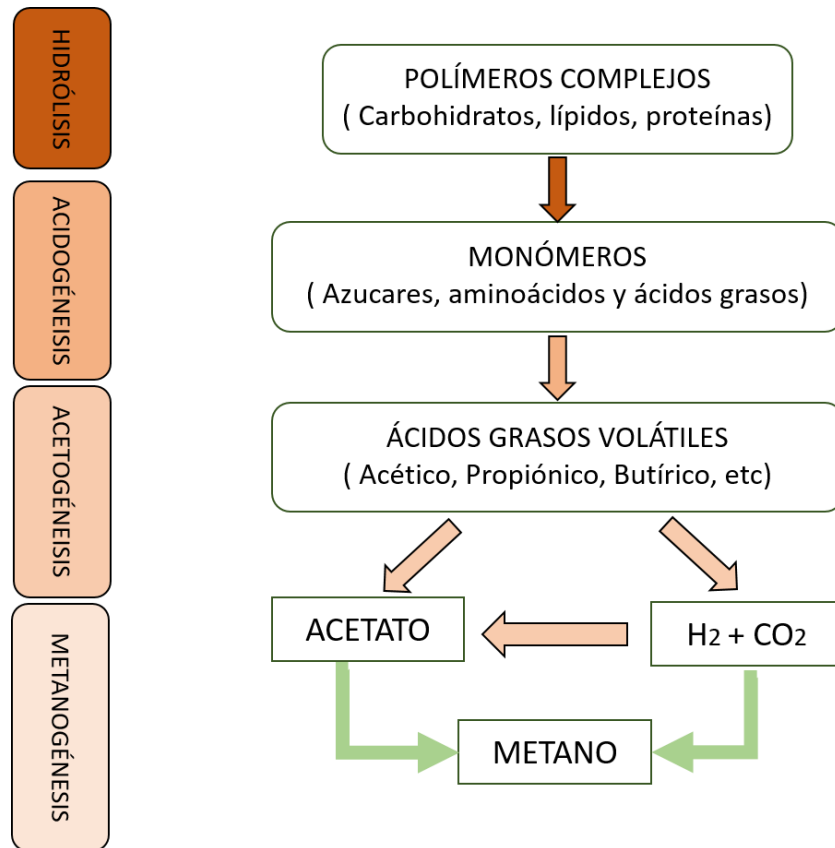
**Tabla 6. Fermentación oscura para producción de hidrógeno en diferentes sistemas.**

Inóculo	Sustrato (Concentración inicial)	Temp (°C)	RIS	Parámetros cinéticos (Modelo Gompertz modificado)	$Y_{H_2}$	Ref	Referen cia: 1, G. Cao et al. (2009); 2, Pattr et al. (2008); 3, Ozmihci et al. (2011); 4, Datar et al. (2007); 5, Zhang et al. (2015); 7, Lalauret te et al. (2009).
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> W16	Hidrolizados ácidos de rastrojo de maíz (11.84 g/L)	60	0.0123	$H_{max}=165.25$ mL $R_{max} = 5.51$ mL/h $\lambda=4$ h, $t= 30$ h	2.24 mol $H_2$ /mol azúcar total	1	
<i>Clostridium butyricum</i>	Hidrolizados ácidos de bagazo de caña de azúcar (20 g/L)	37	0.001	$H_{max}=180$ mL $R_{max} = 3$ mL/h $\lambda=5$ h, $t= 60$ h	1.73 mol $H_2$ /mol azúcar total	2	
Lodo anaerobio	Residuos de harina de trigo (19.25 g/L)	55	0.077	$H_{max}=364.16$ mL $R_{max} = 4.33$ mL/h $\lambda=16.85$ h, $t= 216$ h	0.90 mol $H_2$ /mol azúcar total	3	
Lodo anaerobio	Glucosa (25 g/L)	35	1	$R_{max} = 905$ mL/h $\lambda=15$ h	2.86 mol $H_2$ /mol glucosa	4	
Lodo anaerobio	Hidrolizado ácido de rastrojo de maíz (2 g/L)	35	0.4	$H_{max}=92.82$ mmol $R_{max} = 6.93$ mmol/h $\lambda=28$ h, $t= 55$ h	3 mol $H_2$ /mol azúcar total	4	
Lodo activado	Hidrolizado ácido de rastrojo de maíz (5 g/L)	37	0.032	$H_{max}=990$ mL $R_{max} = 16.5$ mL/h $\lambda=15.3$ h, $t= 60$ h	2.70 mmol $H_2$ / g azúcar utilizado	5	
Lodo granular anaerobio	Hidrolizado ácido de rastrojo de maíz (5 g/L)	55	0.192	$H_{max}=2598$ mL $R_{max} = 43.3$ mL/h $\lambda=16.6$ h, $t= 60$ h	7.74 mmol $H_2$ / g azúcar utilizado	5	
<i>Clostridium thermocellum</i>	Hidrolizado ácido de rastrojo de maíz (1.67 g/L)	50	0.15	$H_{max}=1191$ mL $R_{max} = 12.40$ mL/h $\lambda=10$ h, $t= 96$ h	1.67 mol $H_2$ / mol de glucosa	7	



#### 2.2.4. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia se presenta como una tecnología para la degradación de materia orgánica en ausencia de oxígeno y su conversión en biogás y un digerido líquido que por sus propiedades puede ser utilizado como fertilizante. El biogás tiene un contenido elevado de metano ( $\text{CH}_4$ ), alrededor del 50-70% y puede ser utilizado en procesos de combustión. La digestión anaerobia se desarrolla en 4 etapas (Figura 2) : hidrólisis de las macromoléculas, *acidogénesis* (formación de ácidos grasos), *acetogénesis* (producción de acetato) y *metanogénesis* (producción de metano), cada una de estas etapas con diferente cinética, pero en sincronía metabólica con las otras en condiciones de estabilidad (Zhang et al., 2016)



**Figura 2. Bioquímica de la digestión anaerobia.** Modificada de (Beltrán et al., 2016)

Por esta razón existen diferentes factores que afectan el desarrollo de la digestión anaerobia. Inicialmente la digestión anaerobia la realizan diferentes microorganismos en ausencia de oxígeno, ya que una existencia de oxígeno puede inhibir el metabolismo microbiano. Otro parámetro importante a tener en cuenta en

procesos de digestión anaerobia es la temperatura, la mayoría de procesos se realizan en régimen mesofílico, con temperaturas que oscilan entre los 25 a 40 °C (Parra et al., 2014). Otra variable a controlar es la acidez de los sistemas, pH inferiores a 7.0 unidades pueden inhibir la generación de metano; esta acidez se da por la producción de ácidos grasos volátiles en la etapa de acidogénica. Esta acidez se debe también a la acumulación de sustrato por las elevadas cargas orgánicas presentes en los sistemas. (Mao et al., 2015).

La evaluación de la producción de biogás, específicamente de metano, está determinada por el potencial de biometanización (PBM), que es la cantidad de metano producido por cantidad de sustrato alimentado. Los ensayos de potencial de biometanización ayudan a predecir el comportamiento de los consorcios microbianos en la degradación anaerobia de los sustratos en términos de producción de biogás (Q. Zhang et al., 2016). Muchas investigaciones concluyen que el parámetro que más influye en PBM es la fuente de inóculo, pero no solamente la fuente de inóculo sino que también la cantidad de inóculo, de acuerdo con esto, la relación inóculo sustrato (RIS) puede afectar tanto la biodegradabilidad de un sustrato como la tasas de producción de metano; pero también se es necesario saber cómo afecta a la DA la composición del sustrato (Moset et al., 2015), ya que si la RIS es muy baja y el sustrato muy ácido, puede haber inhibición en la producción de metano por acidificación, o si la RIS es muy alta, puede existir un bajo rendimiento de metano (Zeng et al., 2010).

Las producciones acumuladas de metano en sistemas batch se pueden ajustar a modelos matemáticos para predecir los efectos positivos (altos rendimientos) o negativos (inhibición) durante el desarrollo de la DA. Lo et al., (2010) propusieron un modelo para determinar el PBM a partir del modelo modificado de Gompertz, el cual se presenta en la ecuación 2:

$$PBM(t) = B_0 \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m \cdot e}{B_0} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

**Ecuación 2. Modelo modificado de Gompertz para la producción de metano.**

Donde PBM(t) es el rendimiento de metano acumulado a cualquier tiempo (mL CH<sub>4</sub>/g SV), B<sub>0</sub> el máximo rendimiento de metano en la fermentación (mL CH<sub>4</sub>/g SV), R<sub>m</sub> la tasa de producción máxima de metano (mL CH<sub>4</sub>/g SV d), “e” es el número de Euler, λ la duración de la fase lag (d) y t el tiempo de fermentación (d). En la Tabla 7 se presenta la comparación de las RIS y los B<sub>0</sub> de diferentes investigaciones en DA con diversidad de sustratos como fuentes de carbono.

**Tabla 7. Producción de metano a partir de sustratos residuales.**

Inóculo	Sustrato	Condiciones de operación	Relación Inóculo sustrato <sup>a</sup>	Producción de metano// Parámetros cinéticos	B <sub>0</sub> (L CH <sub>4</sub> /kg SV)	Ref
Efluente líquido de DA	Rastrojo de maíz	T= 37 °C t= 40 días pH <sub>inicial</sub> =8.9 V <sub>0</sub> = 1.4 L	0.29	CH <sub>4</sub> acu= 248.27 L % CH <sub>4</sub> = 55%	372.4	1
Lodo de digestor anaerobio	Rastrojo de maíz seco	T= 35 °C t= 182.3 días V <sub>0</sub> =0.2 L	0.77	R <sub>m</sub> = 15.77 (mL/(g SV d)) λ= 0.54 d	234.8	2
Lodo líquido de digestor anaerobio	Rastrojo de maíz	T= 37 °C V <sub>0</sub> = 1 L t= 35 días pH <sub>inicial</sub> =8.8	0.29	R <sub>m</sub> = 3.05 (mL/(g SV d))	107	3
Lodo líquido de digestor anaerobio	Rastrojo de maíz	T=36 °C V <sub>0</sub> = 1 L t= 38 días pH <sub>inicial</sub> = 8.8	0.45	R <sub>m</sub> = 2.71 (mL/(g SV d))	103	4
Efluente de digestor de estiércol de vaca	Mezcla de algas	T= 35 °C V <sub>0</sub> =0.120 L t= 30 días pH <sub>inicial</sub> = 7.23	2	R <sub>m</sub> = 4.62 (mL/(g SV d))	140.48	5
Efluente de digestor de estiércol de cerdo	FORSU	T= 55 °C t= 40 días	1.4	R <sub>m</sub> = 0.875 (mL/(g SV d))	35	6
Residuo digestato	FORSU	T= 35 °C V <sub>0</sub> =0.08 L	0.52	NR	90.57	7

Referencia: 1, J. Zhu et al. (2010); 2, D. Li et al. (2016); 3, Z. Wang et al. (2013); 4, Shi et al. (2014); 5, Zeng et al. (2010); 6, Fantozzi et al (2011); 7, Rodríguez-Cordero et al. (2017)

Nota: <sup>a</sup> Valores calculados a partir de las cantidades iniciales de sustrato e inóculo. CH<sub>4</sub> acu: Metano acumulado; NR: No reportado.

Otro bioproceso que se enfoca en la producción de hidrógeno a partir de residuos orgánicos es la fotofermentación (FF). La FF es atractiva porque puede utilizar fuentes ricas de carbohidratos (azúcares fermentables) o ácidos grasos volátiles generados en otros procesos como la fermentación oscura (Keskin et al., 2011; Sagnak et al., 2011). En comparación a la producción de hidrógeno por FO, FF requiere de luz como fuente de energía para la degradación de los compuestos (Argun et al., 2011).

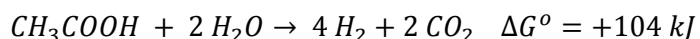
Este diagrama de flujo ilustra el metabolismo energético en bacterias fotosintéticas, mostrando la integración entre la fotosíntesis y la respiración.

**Componentes y Flujo:**

- Membrana fotosintética:** Recibe **Energía lumínica** y **H<sup>+</sup>** desde el exterior de la membrana. Está conectada a la **ATP Sintasa** y la **Nitrogenasa**.
- ATP Sintasa:** Genera **ATP** a partir de un gradiente de **H<sup>+</sup>** y transfiere electrones a la **Nitrogenasa**.
- Nitrogenasa:** Recibe electrones desde el **Ciclo TCA** y la **Membrana fotosintética**. Produce **H<sub>2</sub>**, que es utilizado por la **Hidrogenasa** para generar **Electrones, H<sup>+</sup>**.
- Hidrogenasa:** Convierte **H<sub>2</sub>** en **Electrones, H<sup>+</sup>**, que son devueltos a la **Membrana fotosintética** para el ciclo.
- Ciclo TCA:** Recibe sustratos como **Glucosa**, **Lactato**, **Malato**, **Acetato** y **butirato**. Libera **CO<sub>2</sub>** y proporciona electrones a la **Nitrogenasa**.
- Biosíntesis y crecimiento de productos:** Recibe sustratos directamente desde el punto de entrada y a través de una vía ramificada (indicada por una línea punteada).

22

Las reacciones de conversión de diferentes sustratos en hidrógeno por medio de microorganismos fotofermentativos son reacciones que tienen un cambio de energía libre positivo, lo cual indica que en las reacciones no son espontáneas y requieren una fuente externa de energía en forma de luz, ya sea solar o artificial (Manish et al., 2008). La ecuación 3 muestra la producción teórica de  $H_2$  a partir de una mol de ácido acético con el requerimiento de energía.



### **Ecuación 3. Producción de hidrógeno a partir de ácido acético. Requerimiento de energía**

Si bien, para el desarrollo de la FF es importante la fuente de energía, también se debe estudiar el desarrollo de la fermentación de acuerdo al tipo de fuente de energía y su intensidad, ya que pueden existir variaciones en los rendimientos de hidrógeno. Argun et al. (2010) estudiaron la influencia del tipo de fuente la intensidad de luz en la FF de un efluente de la FO de trigo molido, encontrando un valor de hidrógeno acumulado de 252 mL y un rendimiento de 781 mL  $H_2$ /g AOV usando una lámpara de halógeno, estos valores fueron superiores a los encontrados con lámparas de tungsteno, infrarrojo, fluorescente y radiación solar, debido a que la cepa utilizada (*Rhodobacter sp*) tiene una absorción máxima de luz a dos distintas longitudes de onda (590 y 863) y la lámpara de halógeno fue la que mayor rango de longitudes de onda tiene, incluyendo 590 y 863. También en este estudio, se evaluó el efecto de la intensidad lumínica en la producción de hidrógeno usando diferentes intensidades (1, 3, 5, 7, 10 klx), encontrando inhibición de la producción de hidrógeno a intensidades superiores a los 5 klx y largos tiempos de adaptación con intensidades inferiores a los 5 klx. De acuerdo con lo anterior se hace necesario evaluar el comportamiento en la producción de hidrógeno con diferentes fuentes e intensidades de luz.

Se han encontrado algunas ventajas en la producción en serie de hidrógeno combinando la FO y la FF, entre ellas el uso de los efluentes de la FO ricos en AOV y el aumento en los rendimientos totales de hidrógeno con respecto a los sustratos utilizados en la FO (Argun et al., 2011). De acuerdo con esto, es necesario evaluar las variantes de la FF para así aprovechar al máximo los AOV provenientes de la FO. En este sentido, se ha evaluado el efecto de la fuente de carbono y sus concentraciones, debido a que bajas concentraciones pueden causar limitaciones de sustrato y altas

concentraciones pueden causar inhibición por producto, al igual que la fuente de nitrógeno y sus concentraciones debido a una posible inhibición por amonio o bajo crecimiento microbiano (Jung-Yeol et al., 2012; Keskin et al., 2011; Oliveira et al., 2014). En la Tabla 8 se pueden ver algunas investigaciones de FF que utilizan AOV de la FO, detallando las concentraciones de fuente de carbono, fuente de nitrógeno, pH de operación y rendimientos de hidrógeno.

Al igual que la FO y la DA, el modelo modificado de Gompertz descrito en la sección 2.2.3. se ha usado para describir el proceso de producción de  $H_2$  mediante el bioproceso de la FF; para predecir las producciones y rendimientos máximos, así como la fase de adaptación de los microorganismos al sustrato.

**Tabla 8. Producción de hidrógeno por FF a partir de efluentes de FO**

Fuente de carbono	Fuente de Nitrógeno	Microorganismo	Condiciones de cultivo	Resultados	Ref
Ácido acético (0.84 g/L) Ácido butírico (4.35 g/L)	Glutamato de sodio (0.9359 g/L)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SH2C	V <sub>0</sub> = 37 mL T= 30 °C Ev <sup>a</sup> = 4 klx pH <sub>inicial</sub> = 7	H <sub>max</sub> =250.6 mL R <sub>max</sub> = 3.39 mL/h t= 300 h Y <sub>H2,t</sub> =6.25 mol H <sub>2</sub> /mol sacarosa Y <sub>H2,p</sub> =1.305 LH <sub>2</sub> /gAOV	1
Ácido acético (2.68 g/L) Ácido butírico (0.96 g/L)	NH <sub>3</sub> Cl (0.1 g/L)	<i>Rhodopseudomonas BHU 01</i>	V <sub>0</sub> = 100 mL T= 34 °C Ev= 5.8 klx <sup>b</sup> pH <sub>inicial</sub> = 6.8	H <sub>max</sub> =75.5 mL R <sub>max</sub> = 0.79 mL/h t= 96 h Y <sub>H2,t</sub> = Y <sub>H2,p</sub> =0.207 LH <sub>2</sub> /gAOV	2
Ácido acético (5 g/L) Ácido levulínico (0.4 g/L) Xilosa (4.3 g/L)	Glutamina (1 g/L)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ZX-5	V <sub>0</sub> = 35 mL T= 30 °C Ev= 4.5 klx pH <sub>inicial</sub> = 7	H <sub>max</sub> = 245 mL R <sub>max</sub> = 0.98 mL/h t= 250 h Y <sub>H2,t</sub> = Y <sub>H2,p</sub> =0.721 LH <sub>2</sub> /gsustrato	3
Ácido acético (0.9706 g/L) Ácido butírico (2.37 g/L)	Glutamato de sodio (1.87 g/L)	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	V <sub>0</sub> = 250 mL T= 30 °C Ev= 6 klx pH <sub>inicial</sub> = 7	H <sub>max</sub> = 1241 mL R <sub>max</sub> = 8.62 mL/h t= 144 h Y <sub>H2,t</sub> =3.42 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa Y <sub>H2,p</sub> =1.485 LH <sub>2</sub> /gAOV	4
Ácido acético (0.5 g/L) Ácido butírico (1.2 g/L)	Extracto de levadura (10 g/L)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	V <sub>0</sub> = 120 mL T= 32 °C Ev= 15 klx pH <sub>inicial</sub> = 7	H <sub>max</sub> = 272.4 mL R <sub>max</sub> = 1.09 mL/h λ= 13.4; t= 250 h Y <sub>H2,t</sub> =5.57 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa Y <sub>H2,p</sub> =1.335 mLH <sub>2</sub> /gAOV	5
AOV (1.465 g/L)	Amonio (2.2 mg/L)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> -RV	V <sub>0</sub> = 200 mL T= 30 °C Ev= 5 klx pH <sub>inicial</sub> = 7.3	H <sub>max</sub> = 88.07 mL R <sub>max</sub> = 1.04 mL/h λ= 30.63; t= 85 h Y <sub>H2,t</sub> =4.55 mol H <sub>2</sub> /mol glucosa Y <sub>H2,p</sub> =0.3 LH <sub>2</sub> /gAOV	6
AOV (1.950 g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.01 g/L)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (NRRL-B1727)	V <sub>0</sub> = 2000 mL T= 30 °C Ev= 5 klx pH <sub>inicial</sub> = 7.3	R <sub>max</sub> = 2.29 mL/h Y <sub>H2,AOV</sub> =0.185 L H <sub>2</sub> /gAOV	7

Referencias: 1, Tao et al. (2007); 2, Rai et al. (2014); 3, Z. Zhu et al. (2010); 4, Su et al. (2009); 5, Zagrodnik et al. (2015); 6, Argun et al. (2010); 7, Ozmihci et al. (2010).

Nota: <sup>a</sup> Ev, Iluminancia; <sup>b</sup> Calculado con la equivalencia de 1 W/m<sup>2</sup>= 683 lx. NR: No reportado. Y<sub>H2,t</sub>: Rendimiento total(FO+FF). Y<sub>H2,p</sub>: rendimiento asociado a la FF.

### 2.3. Análisis de ciclo de vida

El análisis de del ciclo de vida (ACV) es una metodología para la evaluación de impactos ambientales y consumo de recursos durante la prestación de servicios o la generación de productos (Guinée et al., 2001). Existen diversos protocolos para la evaluación de los impactos ambientales por la emisión gases de efecto invernadero basados, por ejemplo, en las normas ISO 14040 y ISO 14044 (ISO, 2006a,ISO 2006b), entre otros.

Un LCA se enfoca en tres áreas de protección: salud humana, medio ambiente y recursos naturales. Un modelo de biorrefinería como un proceso de consumo de materia y generación de productos, es propenso a la generación diversos impactos ambientales a través de las diferentes etapas. Por lo anterior, y en concordancia con las tres áreas de protección, se debe tener en cuenta la afectación del uso de fuentes de biomasa que tienen ya definido su fin principal en la generación de energía, es el caso de los cultivos de pan comer como el maíz, la caña de azúcar (Silalertruksa et al., 2016), estos tienen potencial para la generación de bioenergéticos pero hacen parte de las fuentes principales de alimentos (Blanco-Londoño et al., 2012). Respecto al uso de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos, no existe alguna limitante en su uso ya que no tiene alguna utilidad directa. En este sentido, su uso en sistemas de conversión energética contribuye a la disminución de contaminación por el transporte y disposición final (P. Chen et al., 2016; Escamilla-Alvarado, 2014).

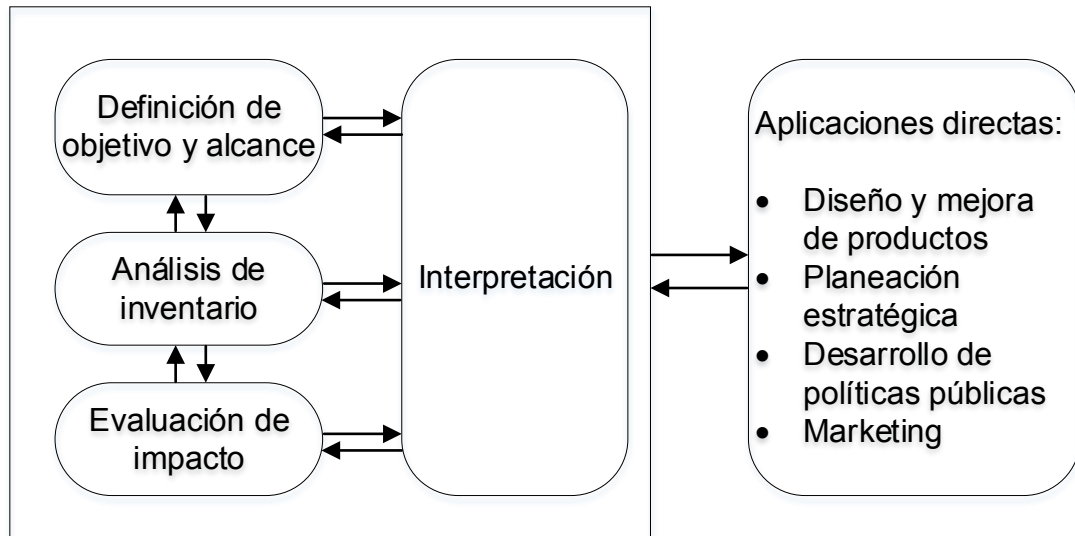
Por medio del ACV, la producción de bioenergéticos mediante modelos de biorrefinería a partir de fuentes renovables, puede ayudar a la evaluación de su rentabilidad y respeto con el medio ambiente (Poggi-Varaldo et al., 2014). Un ACV permite comparar alternativas de generación de bioenergéticos a partir de residuos orgánicos con otros procesos de tratamiento y disposición de residuos sólidos, en un ámbito energético y ambiental (Svanstr, 2015).

El LCA debe cumplir las siguientes 4 fases (Figura 4):

- 1) Definición de un objetivo y alcance. En esta fase se establecen los objetivos, límites, unidades funcionales, y requerimientos de información
- 2) Análisis de inventarios del ciclo de vida. En esta fase se detallan los procesos involucrados con todas las emisiones al ambiente, producción, uso de energía y uso de energía.



- 3) Evaluación de impacto. Se evalúan los impactos potenciales en función de las sustancias emitidas, su cantidad y su disposición final.
- 4) Interpretación. Está referida a la toma de decisiones desde el punto de vista de impacto ambiental del producto o servicio.



**Figura 4. Esquema de un ACV.** Tomada de (ISO, 2006b)

### **3. HIPÓTESIS**

Un modelo de biorrefinería para la producción de hidrógeno y metano a partir de residuos orgánicos tendrá mayores rendimientos energéticos y ambientales que un proceso de digestión anaerobia convencional.

### **4. OBJETIVOS**

#### *Objetivo general*

Desarrollar un proceso en serie-paralelo para la producción de hidrógeno y metano a partir de residuos orgánicos comparándolo con un proceso de digestión anaerobia convencional.

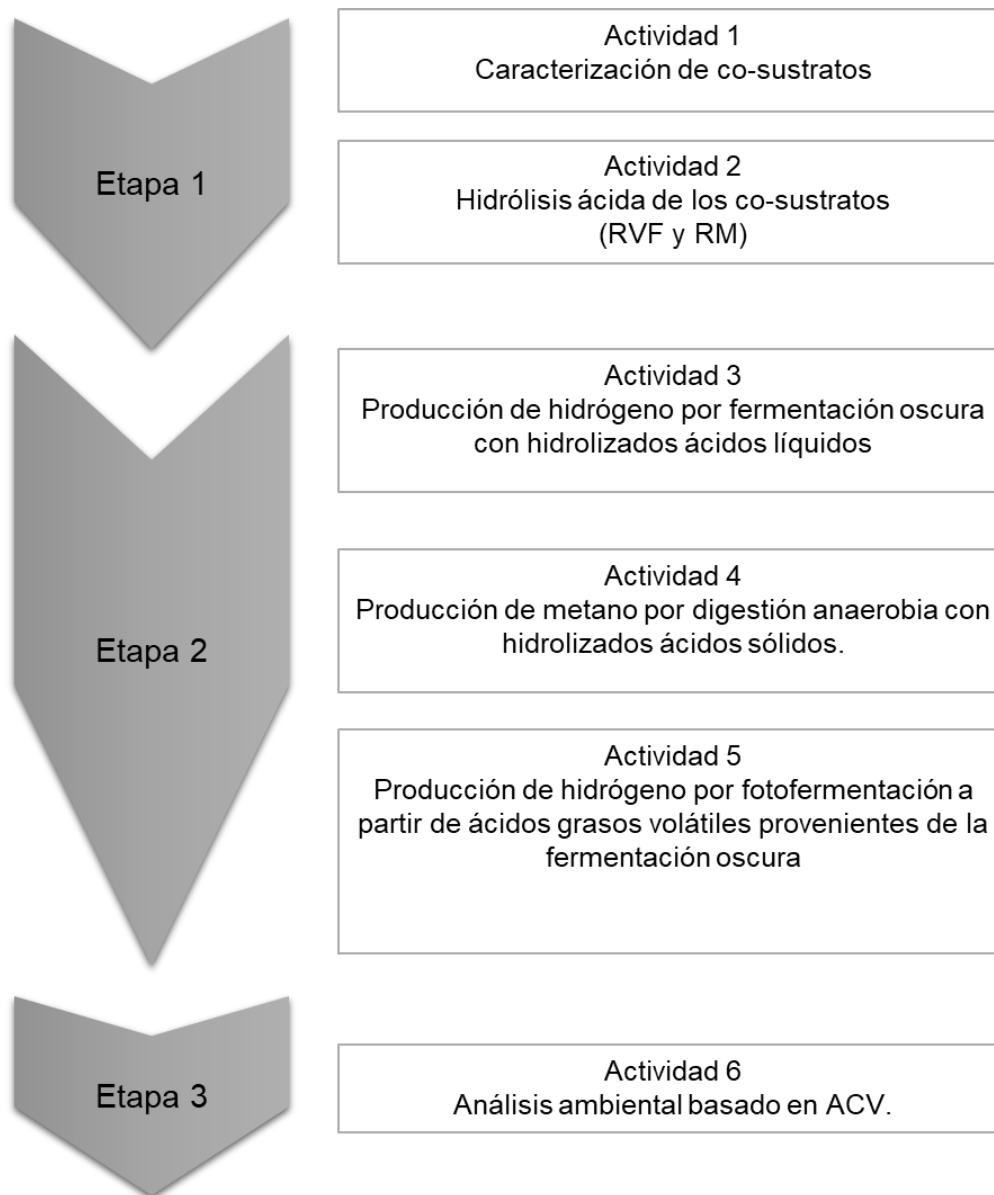
#### *Objetivos específicos*

- Evaluar el efecto de la concentración de co-sustratos orgánicos en la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida.
- Producir hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos líquidos de RVF y RM por fermentación oscura.
- Generar metano a partir de hidrolizados ácidos sólidos de RVF y RM, por digestión anaerobia.
- Producir hidrógeno a partir de AOV por fotofermentación.
- Realizar análisis ambiental basado en ACV del modelo de biorrefinería.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Plan de trabajo

La Figura 5 representa el plan de trabajo para el modelo de biorrefinería planteado.



**Figura 5. Esquema plan de trabajo.**

Esta investigación se desarrolló en tres etapas. La etapa 1 se dividió en dos actividades: la caracterización fisicoquímica de los sustratos (RVF y RM) y la hidrólisis ácida diluida de la combinación de RVF y RM. En la etapa 2 se evaluó la producción de hidrógeno por FO, metano por DA e hidrógeno por FF complementando así las actividades 3, 4 y 5 respectivamente. La actividad 6 pertenece a la etapa 3 que

corresponde al ACV del modelo de biorrefinería, comparando la obtención de energía y los impactos ambientales generados con un sistema de digestión anaerobia.

## 5.2. Actividad 1. Caracterización de co-sustratos

### 5.2.1. Propósito

Realizar la caracterización fisicoquímica de los sustratos RVF y RM

### 5.2.2. Diseño experimental

Al realizar la caracterización fisicoquímica de los sustratos, RVF y RM se determinará su composición y características iniciales.

### 5.2.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 9 muestra los diferentes análisis de caracterización realizados a los co-sustratos.

**Tabla 9. Parámetros para caracterizar los sustratos**

Parámetro	Frecuencia	Método	Ref
pH	Lote	Potenciométrico	1
Sólidos totales	Lote	Gravimétrico	2
Sólidos volátiles	Lote	Gravimétrico	2
Alcalinidad	Lote	Titulación	3
Ácidos grasos volátiles	Lote	Titulación	3
Celulosa	Lote	Gravimétrico	4
Hemicelulosa	Lote	Gravimétrico	4
Lignina	Lote	Gravimétrico	4
Análisis elemental	Lote	Combustión	5
DRX	Lote	DRX	6
ATG	Lote	Termogravimetría	7
Nitrógeno total Kjeldahl	Lote	Colorimetría	8
Poder calorífico	Lote	Combustión	9

Referencia: 1, NMX-AA-25-1984. (1992); 2, APHA/AWWA/WEF. (2012); 3, Anderson et al. (1992); 4, AOAC. (1992); 5, Vazquez. (2008); 6, Segal et al. (1959); 7, Zambrano-Arévalo. (2015) 8; EPA-821-R-01-004. (2001); 9, DGN-AA-33-1976. (1976)

### 5.2.4. Métodos y procedimientos

#### 5.2.4.1. Recolección y preparación del RM y RVF

El RM se recolectó del lugar el Pasaje en el municipio de Cuencamé, Durango, se secó durante 24 h a una temperatura de 85 °C. Posteriormente se trituró en un molino de estrella manual y se tamizó hasta obtener partículas menores 180 µm y se almacenó en condiciones de baja humedad.

Los RVF se recolectaron del restaurante escolar de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y casas aledañas. Estos residuos fueron triturados y homogenizados con un procesador de alimentos (Hamilton Beach), posteriormente fueron secados a 85 °C durante 24 h. Después del secado, se trituraron y se tamizaron hasta obtener un tamaño de partícula de 180 µm, después se almacenaron en condiciones de baja humedad. En el ANEXO A, se puede ver el RM y los RVF antes y después de su procesamiento.

#### *5.2.4.2. Análisis de sólidos, alcalinidad y AOV.*

Los análisis de humedad, sólidos totales, sólidos volátiles y cenizas se realizaron siguiendo el método estándar APHA/AWWA/WEF. (2012). El pH se determinó en el sobrenadante después de hacer una extracción con agua destilada tanto del RM como de los RVF en una relación 1:5 p/v muestra-agua respectivamente con un medidor de pH (Conductronic PC45, México). Una alícuota de 5 mL de extracto se utilizó para determinar la alcalinidad y los ácidos grasos volátiles presentes en los co-sustratos; utilizando HCl 0.1 N para la alcalinidad y NaOH 0.1 N para los ácidos grasos volátiles, siguiendo la metodología de Anderson et al, (1992).

#### *5.2.4.3. Análisis de celulosa, lignina, hemicelulosa y nitrógeno total Kjeldahl*

El análisis de celulosa se realizó por el método gravimétrico expresado por AOAC, (1992), se removió la lignina y la hemicelulosa con ácido nítrico y ácido acético 70 %v/v, finalmente se calcina la muestra y por diferencia de masa se calcula el % de celulosa presente.

El análisis de lignina insoluble se realizó en base gravimétrica, extrayendo inicialmente los carbohidratos presentes en los residuos orgánicos mediante una hidrólisis ácida concentrada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % durante una hora, seguida de una hidrólisis ácida diluida seguida de la recuperación de la biomasa mediante filtración; la materia insoluble presente los hidrolizados sólidos se cuantifica como lignina.

El contenido de hemicelulosa se determinó a partir de la diferencia de masas entre holocelulosa y celulosa, ya que la holocelulosa es la suma de celulosa y hemicelulosa. La determinación de holocelulosa se realizó en base gravimétrica mediante el método AOAC, (1992). Esta determinación se realizó por la cloración de las muestras usando NaHClO el cual oxida la lignina, siendo la diferencia entre el peso inicial antes de la cloración y el peso final después de la cloración el contenido de

holocelulosa. Tanto para celulosa, hemicelulosa y lignina se hizo la corrección del contenido de cenizas.

La determinación de nitrógeno total Kjeldahl se realizó mediante el método de digestión Kjeldahl, al descomponer el nitrógeno presente en los residuos orgánicos utilizando una solución de ácido concentrado.

#### **5.2.4.4. *Análisis elemental, TGA, DRX y poder calorífico.***

La determinación de C, H, O y N se realizó en un laboratorio de servicios externos. El análisis termogravimétrico se realizó para determinar la estabilidad térmica de los co-sustratos en un equipo de análisis termogravimétrico (TGA Q 500, TA Instruments, USA). El calentamiento fue desde 25 °C hasta 700 °C con una rampa de calentamiento de 10°C/min en atmósfera oxidante.

Con la difracción de rayos X se determinó la cristalinidad de los co-sustratos, antes de pretratamiento de la hidrólisis ácida, como una medida de la estabilidad estructural de los co-sustratos. Las muestras fueron analizadas en un difractómetro de rayos X Siemens D5000 (Serie E04-0012), a temperatura ambiente con radiación monocromática CuK $\alpha$  con un rango de 2 $\theta$  de 10° hasta 50° con un tamaño de paso de 0.04°, de acuerdo a la metodología propuesta por Johar et al, (2012). La cristalinidad de cada sustrato fue caracterizada a partir del índice de cristalinidad (ICr), el cual fue calculado a partir de los datos de intensidad reflectada siguiendo el método de Segal et al, (1959). La ecuación 4 relaciona el ICr con las intensidades de la fracción cristalina (plano (0 0 2)) de la celulosa y fracción amorfa los cuales se encuentran en valores del ángulo de difracción 2 $\theta$ =22° y 2 $\theta$ = 18° respectivamente.

$$ICr (\%) = \frac{I_{(0\ 0\ 2)} - I_{am}}{I_{(0\ 0\ 2)}} \cdot 100$$

#### **Ecuación 4. Determinación del índice de cristalinidad (ICr)**

### **5.3. Actividad 2. Hidrólisis ácida de co-sustratos orgánicos (RM y RVF)**

#### **5.3.1. *Propósito***

Evaluar el efecto de la concentración de co-sustratos orgánicos en la producción de azúcares fermentables.

### 5.3.2. Diseño experimental

Para la hidrólisis ácida de la combinación de RVF y RM se eligió un diseño experimental factorial general 5x2, teniendo como factores: concentración de co-sustratos y el tipo de ácido teniendo como respuesta la concentración de azúcares en los hidrolizados líquidos y la conversión los co-sustratos en azúcares. La Tabla 10 muestra el diseño de experimental con los niveles para cada factor y las condiciones de hidrólisis (temperatura y tiempo: basadas en los experimentos de Carrillo-Verastegui et al., (2017)). Para el desarrollo de la hidrólisis ácida se evaluaron dos tipos de ácido ( $H_2SO_4$  y  $HCl$ ). Como control de la hidrólisis se hicieron hidrólisis con 100 % de RVF y 100 % de RA. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

**Tabla 10. Diseño de experimento de hidrólisis ácida**

Combinación	Sustrato (%)		Ácidos catalizadores (0.5 % v/v)		Temperatura	Tiempo de reacción
	RVF	RM				
1	25	75			120 °C	2 h
2	50	50	HCl	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
3	75	25				

### 5.3.3. Programa de seguimiento y análisis

La Tabla 11 muestra los análisis realizados a los hidrolizados líquidos con el objetivo de determinar los azúcares presentes. Se determinó el contenido de azúcares reductores y la concentración de azúcares monoméricos (glucosa, xilosa y arabinosa).

**Tabla 11. Técnicas para la determinación de azúcares en los hidrolizados líquidos**

<b>Técnica</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Ref</b>
Azúcares reductores (DNS)	Azúcares reductores [g glucosa/L]	Lote	1
HPLC	Glucosa, xilosa, arabinosa, HMF, Furfural, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido láctico [g/L]	Lote	2
Folin Ciocalteu	Compuestos fenólicos totales [g/L]	Lote	3

Ref.: 1, Saqib et al. (2011); 2, Sluiter et al. (2010); 3, Blainski et al. (2013)

Nota: HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia.

Los hidrolizados sólidos fueron caracterizados para evaluar el desempeño del pretratamiento de hidrólisis ácida y su posterior uso como sustrato para la digestión anaerobia, en la Tabla 12 se observan los parámetros determinados.

**Tabla 12. Análisis de los hidrolizados sólidos.**

<b>Parámetro</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Método</b>	<b>Ref</b>
pH	lote	Potenciométrico	1
Sólidos totales	Lote	Gravimétrico	2
Sólidos volátiles	Lote	Gravimétrico	2
Celulosa	Lote	Gravimétrico	3
Hemicelulosa	Lote	Gravimétrico	3
Lignina	Lote	Gravimétrico	3
Nitrógeno total Kjeldahl	Lote	Colorimetría	4
TGA	Lote	Termogravimétrico	5
DRX	Lote	DRX	6
Análisis elemental	Lote	Combustión	7

Referencia: 1, NMX-AA-25-1984. (1992); 2, APHA/AWWA/WEF. (2012); 3, AOAC. (1992); 4, EPA-821-R-01-004, (2001); 5, Zambrano-Arévalo, (2015); 6, Segal et al- (1959); 7, DGN-AA-33-1976- (1976)



#### 5.3.4. Métodos y procedimientos

##### 5.3.4.1. Hidrólisis ácida de co-sustratos

Las combinaciones de los co-sustratos, previamente secados a 85 °C, se realizaron de acuerdo con lo establecido en la Tabla 10. La hidrólisis de los co-sustratos se llevó a cabo en un termoreactor (HACH DR B200, USA). La carga de sólidos para cada experimento fue del 6.6% con respecto al volumen de reacción (0.33 g de sustrato en 5 mL de ácido catalizador), a cada uno de los tubos de ensayo se le agregaron perlas de agitación para garantizar el contacto líquido-sólido y cada 10 min se agitó manualmente. Una vez terminada la hidrólisis se dejaron enfriar los hidrolizados y la parte líquida se removi6 por centrifugaci6n a 10000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga (MICROMAX RF 120, Inglaterra). Las muestras se congelaron para evitar su degradaci6n.

##### 5.3.4.2. Determinaci6n de la concentraci6n de azúcares en los hidrolizados líquidos (azúcares reductores y azúcares por HPLC).

La glucosa tiene la capacidad de oxidarse y de reducir el ácid6 3,5-dinitrosalicílico en condiciones alcalinas (Saqib et al., 2011). Esta reducci6n se denota por la producci6n de una coloraci6n amarilla que es m6s intensa a concentraciones altas de azúcares reductores. Es una t6cnica colorim6trica y la concentraci6n se determina mediante la lectura de la absorbancia a 550 nm. Se realiz6 una curva de calibraci6n con dextrosa al 0.1 % como est6ndar (ANEXO B). Se tom6 0.5 mL de hidrolizado previamente diluido y se adicionaron 1.5 mL de la soluci6n digestora con DNS, se homogeniz6 en un vortex (Scientific Industries 51-0136, USA), se llev6 a punto de ebullici6n en baño María por 5 min. Se enfri6 mediante choque térmico, despu6s del enfriamiento se adicionaron 3 mL de agua destilada para completar un volumen de 5 mL seguido de la medici6n de la concentraci6n en un espectrofot6metro (HACH DR 6000, USA) a una longitud de onda de 550 nm.

La determinaci6n de azúcares por HPLC se realiz6 en un laboratorio de servicios exteriores.

##### 5.3.4.3. Determinaci6n de compuestos fen6licos totales

Los compuestos fen6licos totales fueron determinados por el m6todo colorim6trico propuesto por Blainski et al, (2013) usando el reactivo Folin Ciocalteu. Para el desarrollo de este m6todo, a 1 mL de muestra se agregaron 0.250 mL del reactivo

Folin Ciocalteu (SIGMA) y después de dejar en reposo por 5 min, se agregaron 0.750 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se dejó reaccionar por 90 min en ausencia de luz y se procedió a medir la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (HACH DR 6000, USA). Para la cuantificación de los compuestos fenólicos, previamente se realizó una curva de calibración (ANEXO C) usando ácido tánico como estándar, siguiendo la misma metodología.

#### *5.3.5. Escalamiento de la hidrólisis ácida diluida.*

Se realizó el escalamiento de los experimentos de hidrólisis ácida diluida con el mejor resultado del diseño de experimento mencionado en la sección 5.3.2. Los experimentos se realizaron en botellas serológicas de 120 mL de volumen total. El volumen de operación fue de 50 mL y la relación de sólidos alimentados fue del 6.6% con respecto al volumen de operación. Las botellas fueron cerradas con un tapón de butilo y un agrafe de aluminio. La hidrólisis se llevó a cabo en una autoclave (FELISA FE-296, México), con el mismo tiempo de reacción mencionado en la sección 5.3.2.

Los hidrolizados líquidos fueron separados de los hidrolizados sólidos por centrifugación a 10,000 rpm por 15 min en una centrífuga (CENTURION SCIENTIFIC K241, Inglaterra), se tomó una alícuota para la cuantificación de los parámetros mencionados en la Tabla 11 y posteriormente fueron almacenados a 4 °C para evitar su degradación.

### **5.4. Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura con hidrolizados ácidos líquidos.**

#### *5.4.1. Propósito*

Producir hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos líquidos de co-sustratos RVF y RM, y recuperación de ácidos grasos volátiles por medio de un proceso de fermentación oscura.

#### *5.4.2. Diseño experimental*

La producción de hidrógeno a partir de hidrolizados ácidos líquidos por FO se llevó a cabo en modo batch en botellas serológicas a temperatura controlada y pH inicial intervenido mediante un diseño experimental 3<sup>2</sup>. En Tabla 13 se observan los tres

niveles para los dos factores: concentración inicial de azúcares reductores y relación inóculo sustrato (RIS = g SV inóculo/g SV sustrato).

**Tabla 13. Diseño experimental fermentación oscura 3<sup>2</sup>**

<b>Concentración inicial de azúcares reductores [g/L]</b>	<b>Relación inóculo/sustrato</b>	<b>Condiciones de operación</b>
10	1.2	Temperatura= 35 ± 1 °C
13	1.0	pH <sub>inicial</sub> =7
16	0.8	Agitación= 150 ± 3 rpm V <sub>0</sub> = 70 mL

#### 5.4.3. Programa de seguimiento y análisis

##### 5.4.3.1. Experimentos en batch

En la Tabla 14 se menciona los análisis realizados a los experimentos de fermentación oscura.

**Tabla 14. Seguimiento experimental de la fermentación oscura en modo batch**

<b>Parámetro</b>	<b>Periodicidad</b>	<b>Ref</b>
pH	Inicial-final	1
Alcalinidad	Final	2
Ácidos grasos volátiles	Final	2
Azúcares reductores	Inicial-final	3
Hidrógeno	6-8 h	

Referencia: 1, NMX-AA-25-1984. (1992); 2, Anderson et al. (1992); 3, Saqib et al. (2011)

#### 5.4.4. Métodos y procedimientos

##### 5.4.4.1. Preparación del inóculo

El inóculo para la producción de hidrógeno por FO fue tomado de un digestor anaerobio alimentado con RVF a un tiempo de retención másico de 30 días. El inóculo fue formado con estiércol de vaca y lodo granular anaerobio de una planta de

tratamiento de agua residual de una cervecería local. El % de metano en el biogás antes de su uso fue de 86 %. El inóculo fue caracterizado en términos de análisis elemental, sólidos, pH, alcalinidad y ácidos grasos volátiles.

Para seleccionar los microorganismos productores de hidrógeno, se realizó un pretratamiento al inóculo. El inóculo se trató con choque térmico a 96 °C en un baño María por 2 h, inhibiendo así el metabolismo de microorganismos productores de metano (Zinatizadeh et al., 2017).

#### *5.4.4.2. Preparación de los hidrolizados líquidos*

Para precipitar algunos compuestos inhibitorios para el metabolismo microbiano, se pretrataron los hidrolizados líquidos mediante el proceso de “Overliming” descrito por Martinez et al, (2000). Para el desarrollo de este proceso, a los hidrolizados se les agregó  $\text{Ca(OH)}_2$  sólido hasta un pH de 10. Estos se dejaron en agitación durante 1 h, después se removió el precipitado por centrifugación (10000 rpm por 15 min), posteriormente se ajustó el pH a 7 con HCl 6 N seguido de una última centrifugación.

#### *5.4.4.3. Inoculación y arranque*

Los experimentos de fermentación oscura se realizaron por duplicado en botellas serológicas (70 mL de volumen de operación). Todos los experimentos se montaron conforme lo enuncia la Tabla 13. Se agregaron 0.4 mL de medio mineral 200X descrito por Cisneros-Pérez et al, (2017) ( $\text{mg L}^{-1}$ ):  $\text{ZnCl}_2$ , 75;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 100;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 10.77;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 25.97;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.41; and  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 101.25. Para mantener el pH de operación superior a 5.5 se agregó un buffer de fosfatos ( $\text{g/L}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5. Después de la inoculación, los reactores fueron gaseados con nitrógeno para garantizar la atmosfera anaerobia y cerrados con un tapón de hule y un agrafe de aluminio. La fermentación se llevó a cabo en una incubadora (PRENDO INO-650 M, México) con agitación orbital a la temperatura y agitación mencionada en la Tabla 13.

#### *5.4.4.4. Análisis cromatográfico*

El contenido de hidrógeno se midió por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Thermo Scientific (Trace 1310) equipado con un detector de conductividad térmica y una columna de tamiz molecular TG-BOND Msieve 5A (30 m x 0.33 mm). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 100, 150 y 200 °C respectivamente. Se usó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 3 mL/min. La curva de calibración se realizó por triplicado usando  $\text{H}_2$  cromatográfico (INFRA, México) como estándar (ANEXO D). También se realizó la medición volumétrica de hidrógeno por

desplazamiento alcalino en NaOH 1 N; esta medición se realizó después del análisis por cromatografía. El perfil de AOV se determinó por cromatografía de gases al final de la fermentación. Se usó un cromatógrafo de gases Thermo Scientific (Trace 1310) equipado con un detector de ionización de flama y una columna capilar Nukol (Fused silica, Supelco, USA) 30 m x 0.25 mm. La temperatura del inyector y del detector fueron 250 °C y 250 °C respectivamente. El horno fue calentado a 120 °C por 1 min, calentado hasta 140 °C con una rampa de calentamiento de 20 °C min y mantenido a esa temperatura por 1 min. Finalmente se calentó desde 140 °C hasta 240 °C con una rampa de calentamiento de 40 °C/min. Antes del análisis, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 5 min y filtradas en filtros con tamaño de poro de 0.45 µm. Después de filtradas las muestras se acidificaron con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 5 % v/v. Por cada 100 µL de muestra se agregaron 20 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

#### *5.4.5. Escalamiento de la fermentación oscura*

Se evaluó la producción de hidrógeno por FO en un reactor con un volumen de operación de 800 mL. Se agregaron cantidades de inóculo pretratado con choque térmico (declarado en la sección 5.4.4.1.) e hidrolizado ácido líquido correspondientes a la relación con mejor producción de hidrógeno del diseño de experimentos 3<sup>2</sup> (sección 5.4.2.). La concentración de hidrolizado líquido en el reactor se ajustó a 13 g/L de azúcares reductores y la cantidad de inóculo se ajustó a la RIS de 1.2. El pH inicial de la fermentación fue ajustado a 7 con NaOH 3 N. Se agregaron 4 mL del medio mineral 200X y el buffer de fosfatos mencionado en la sección 5.4.4.3. El reactor operó a 35 °C en una incubadora (FISHER SCIENTIFIC 6845, USA) y la agitación fue proporcionada por una plancha de agitación magnética.

El volumen de biogás fue medido por desplazamiento de agua satura con cloruro de sodio y el % de hidrógeno fue medido cada 24 h por cromatografía de gases (sección 5.4.4.4.). Al final de la fermentación se midieron los azúcares reductores finales, compuestos fenólicos totales y el perfil de AOV.

## 5.5. Actividad 4. Producción de metano por digestión anaerobia con hidrolizados ácidos sólidos.

### 5.5.1. Propósito

Producir metano a partir de hidrolizados ácidos sólidos por digestión anaerobia.

### 5.5.2. Diseño experimental

Se realizaron ensayos de biodegradación anaerobia para evaluar la producción de metano a partir de los hidrolizados sólidos, determinando así los potenciales de producción de metano a partir de 5 diferentes relaciones inóculo sustrato. Los ensayos se realizaron en modo batch con temperatura controlada. En la Tabla 15 se pueden ver las condiciones experimentales.

**Tabla 15. Diseño experimental, ensayos de biodegradación anaerobia**

Sustrato	Relación inóculo sustrato	Condiciones de incubación
Hidrolizado ácido sólido 75:25 (RVF:RM)	2; 2.5; 3; 3.5; 4	Temperatura= $35 \pm 1$ °C Agitación= $150 \pm 3$ rpm $V_0 = 70$ mL
RVF	3	

### 5.5.3. Programa de seguimiento y análisis

#### 5.5.3.1. Producción de metano en modo batch

Los experimentos de digestión anaerobia se evaluaron al inicio y al final en términos de ST, SV, pH, ácidos grasos volátiles, alcalinidad. Estos parámetros as de medición se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16. Seguimiento de la biodegradación anaerobia en modo batch.**

Parámetro	Periodicidad	Ref
pH	Inicio-Fin	1
Sólidos totales	Inicio-Fin	2
Sólidos volátiles	Inicio-Fin	2
Alcalinidad	Inicio-Fin	3
Ácidos grasos volátiles	Inicio-Fin	3
Biogás	Diario	4
Metano	Diario	

Referencia: 1, NMX-AA-25-1984. (1992); 2, APHA/AWWA/WEF. (2012); 3, Anderson et al, (1992); 4. Torres Lozada et al. (2010).

#### *5.5.4. Métodos y procedimientos*

##### *5.5.4.1. Preparación del inóculo*

El inóculo para la producción de metano fue tomado de un digestor anaerobio alimentado con RVF a un tiempo de retención másico de 30 días. El inóculo fue formado con estiércol de vaca y lodo granular anaerobio de una planta de tratamiento de agua residual de una cervecería local. El % de metano en el biogás antes de su uso fue de 86 %.

##### *5.5.4.2. Preparación de los hidrolizados sólidos.*

Los hidrolizados ácidos sólidos fueron lavados 2 veces con agua destilada. Para cada lavado se agregaron 30 mL de agua a una masa de 10 g de hidrolizado, esta mezcla se agitó en un vortex y se dejó reposar por 10 min. El agua de lavado se separó por centrifugación (15 min a 10000 rpm). Después de los dos lavados, los hidrolizados sólidos fueron caracterizados según menciona la Tabla 13. Para cuantificar la presencia de azúcares en el agua de lavado, se realizó análisis de azúcares reductores a los dos lotes de agua de lavado.

##### *5.5.4.3. Inoculación y arranque*

Se mantuvo una concentración fija de SV de inóculo (2.5 g SV) para todos los experimentos, solamente se varió la concentración del sustrato de acuerdo con las diferentes RIS propuestas. Los experimentos se realizaron por duplicado en botellas serológicas con volumen de operación de 80 mL, en incubadora (PRENDO INO-650 M, México) a las condiciones mencionadas en la Tabla 15.

Se agregaron las cantidades correspondientes de inóculo y sustrato, se homogenizaron y posteriormente se realizó la medición del pH inicial. Una alícuota de 2 g de cada reactor se usó para la medición de los sólidos iniciales. La alcalinidad inicial se determinó de acuerdo a la sumatoria de alcalinidades presentes tanto en el inóculo como en el sustrato. Como control de la digestión anaerobia, se montaron dos experimentos simultáneos, uno con solo inóculo y otro con inóculo y RVF fresco a una RIS intermedia como se menciona en la Tabla 15. Las botellas fueron gaseadas con N<sub>2</sub> durante 1 min para garantizar la atmosfera anaerobia y seguidamente fueron cerradas con un tapón de hule un agrafo de aluminio.

##### *5.5.4.4. Análisis cromatográfico*

La cantidad de metano en el biogás se midió por cromatografía de gases, en un cromatógrafo Thermo Scientific (Trace 1310) equipado con un detector de

conductividad térmica y una columna de tamiz molecular TG-BOND Msieve 5A (30 m x 0.33 mm). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 100, 150 y 200 °C respectivamente. Se usó nitrógeno como gas acarreador con un flujo de 3 mL/min. La curva de calibración se realizó por triplicado usando CH<sub>4</sub> (GAS INNOVATION, USA) como estándar (ANEXO E). También se realizó la medición del biogás por desplazamiento alcalino en una solución de NaOH 1 N; esta medición se realizó después del análisis por cromatografía.

## 5.6. Actividad 5. Producción de hidrógeno por fotofermentación a ácidos orgánicos volátiles provenientes de la fermentación oscura

### 5.6.1. Propósito

Producir hidrógeno a partir de AOV provenientes de la actividad de fermentación oscura mediante ensayos de fotofermentación.

### 5.6.2. Diseño experimental

#### 5.6.2.1. Reactivación de cepas fotofermentativas y ensayos presuntivos de producción de H<sub>2</sub> a partir de AOV.

Se realizó la reactivación de 4 cepas microbianas fotofermentativas facilitadas por el laboratorio de Electroquímica y fisicoquímica de los materiales e interfases del Instituto Tecnológico de Grenoble, Francia. Las 4 cepas fueron las siguientes: *Rhodopseudomonas pseudopalustris* (DSM 123), *Rhodobacter capsulatus* (DSM 155), *Rhodospirillum rubrum* (DSM 467) y *Rhodobacter sp* (DSM 5864). La evaluación del crecimiento de las 4 cepas se llevó a cabo como se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17. Diseño experimental, reactivación cepas fotofermentativas**

Cepa	Intensidad lumínica (lx)	Condiciones de operación
DSM 123	6000	T= 30 ±1 °C Agitación
DSM 155	10000	
DSM 467	14000	
DSM 5864		

Se realizaron tres experimentos con presuntivos de producción de hidrógeno a partir de AOV de FO que utilizaron glucosa como fuente de carbono con la cepa DSM 467 *Rhodospirillum rubrum*. Con el ensayo presuntivo 1 (P1FF/RCVP/AOV-FO) se comparó la producción de hidrógeno con dos medios de producción de hidrógeno distintos Medio RCV (suplementado con 30 mM de lactato y 5 mM de glutamato como



fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente) y el medio AOV-FO (suplementado con 5 mM de glutamato como fuente de nitrógeno). Las concentraciones iniciales de AOV en el medio AOV-FO fueron 3.492 g/L (AOV-1), 3.844 g/L (AOV-2) y 6.279 g/L (AOV-3). Los ensayos se realizaron por triplicado en botellas serológicas

El ensayo presuntivo 2 (P2FF/RCVP/AOV-FO) se realizó para evaluar la producción de hidrógeno en el medio RCV y en el medio AOV-FO variando la intensidad lumínica de la fermentación (6000, 10000 y 14000 lx). La producción de hidrógeno con el medio RCV conservó las condiciones de ensayo presuntivo 1. La concentración inicial de AOV en el medio AOV-FO fue de 4 g/L y fue suplementado con 5 mmol/L de glutamato como fuente de nitrógeno. Los ensayos se realizaron por duplicado en botellas serológicas usando la cepa DSM 467 *Rhodospirillum rubrum*.

El ensayo presuntivo 3 (P3FF/RCVP/AOV-FO) se realizó para comparar la producción de hidrógeno por fotofermentación a diferentes concentraciones de fuente de nitrógeno usando la cepa DSM 467 *Rhodospirillum rubrum*. La concentración de fuente de C para el medio RCV fue de 30 mM de lactato y la concentración en la fuente de N fue de 5 y 2.5 mM de glutamato. La concentración inicial de AOV en el medio AOV-FO fue de 3 g/L y fue suplementado con 2.5 y 0 mmol/L de glutamato como fuente de N. Los ensayos se realizaron por duplicado en frascos schott y botellas serológicas a 14000 lx y  $30 \pm 1$  °C.

### 5.6.3. Programa de seguimiento y análisis

#### 5.6.3.1. Reactivación de cepas fotofermentativas y ensayos presuntivos de producción de $H_2$ a partir de AOV

El seguimiento a los ensayos de reactivación y presuntivos de producción de hidrógeno se puede ver en la Tabla 18. En estos experimentos se evaluaron las condiciones iniciales y finales en cuanto a la concentración en peso seco de los microorganismos, al igual que la composición de los AOV, como el volumen acumulado de hidrógeno.

**Tabla 18. Seguimiento reactivación de cepas fotofermentativas y presuntivos de producción de H<sub>2</sub> a partir de AOV.**

Actividad	PSC	AOV	Contenido de H <sub>2</sub>
Reactivación de cepas fotofermentativas	10-12 h	ND	ND
(P1FF/RCVP/AOV-FO)	ND	Inicial-final	Final
(P2FF/RCVP/AOV-FO)	10-20 h	Inicial-final	ND
(P2FF/RCVP/AOV-FO)	24 h	Inicial-final	Final

Nota: ND, no determinado.

#### 5.6.4. Métodos y procedimientos

##### 5.6.4.1. Reactivación de cepas fotofermentativas y ensayos presuntivos de producción de H<sub>2</sub> a partir de AOV

Las cepas se inocularon en medio RCV modificado (D. He et al., 2006; Weaver et al., 1975), suplementado con: 30 mM de DL-malato y 7.5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente. Para mantener el pH estable se agregó sales de fosfato (g/L): 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.9 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Un litro de medio RCV de crecimiento contiene 50 mL de solución de supersales las cuales tienen la siguiente composición (1 L de solución de supersales): 0.236 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.4 g de EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·2H<sub>2</sub>O), 1.5 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g de Tiamina (Vitamina B1) y 20 mL de solución de oligoelementos. Un litro de solución de oligoelementos contiene: 2.8 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.592 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.04 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.24 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.752 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.

Los ensayos de reactivación se realizaron en botellas serológicas de 120 mL. 110 mL de medio RCV fueron añadidos a cada una de las botellas. Se ajustó el pH a 6.8 con NaOH 3 N y posteriormente fueron cerradas con un tapón de hule y un agrafe de aluminio. Las botellas fueron esterilizadas en una autoclave (FELISA FE-296, México) durante 15 min a 15 psi. Se agregaron 3 mL de cada cepa con una jeringa bajo condiciones de esterilidad. Los ensayos de reactivación se realizaron en una cámara de fotofermentación con agitación individual, temperatura e intensidad lumínica controlada. La intensidad lumínica se midió con un luxómetro digital (LX1010B). El ajuste a las diferentes intensidades propuestas en la Tabla 17 se realizó por distancia a la fuente de luz. La fuente de luz fue una lampara de alta presión de sodio (SILVANIA).

Cada 10-12 h se tomaron muestras para determinar el peso seco celular (PSC) de cada uno de los experimentos. El PSC se determinó mediante el incremento de la

absorbancia a 660 nm. El PSC de la bacteria es proporcional a la absorbancia a 660 nm y fue calculado con la siguiente relación (Ecuación 5)(D. He et al., 2006):

$$\text{PSC (g/L)} = 0.45 \cdot A_{660}$$

#### **Ecuación 5. Determinación del peso seco celular (PSC) en bacterias fotofermentativas**

El medio RCVP para la producción de hidrógeno contiene las mismas concentraciones de la solución de supersales que el medio de crecimiento RCV, variando solo la fuente de C y N (lactato y glutamato o AOV-FO y glutamato). La cepa DSM 467 *Rhodospirillum rubrum* fue previamente crecida en medio RCV hasta obtener una concentración de PSC superior a los 0.8 g/L, después fue inoculada en el medio RCVP. Las concentraciones iniciales de fuente de C del medio AOV-FO fueron ajustadas por dilución del medio madre de FO y se realizó el mismo tratamiento mencionado anteriormente para la esterilización e inoculación para los ensayos presuntivos 1, 2 y 3. EL biogás fue medido por desplazamiento en probeta de agua saturada de NaCl y el contenido de hidrógeno fue determinado por cromatografía de gases de acuerdo a lo descrito en la sección 5.4.4.4.

### **5.7. Actividad 6. Análisis ambiental basado en el análisis del ciclo de vida**

#### **5.7.1. Propósito**

Realizar una evaluación ambiental y energética del modelo de biorrefinería aplicando la metodología de análisis del ciclo de vida.

#### **5.7.2. Diseño experimental**

Esta actividad se realizó tomando como base la metodología de análisis de ciclo de vida conforme a las normas ISO 14040 y 14044 (ISO 2006, ISO 2006b). Se utilizarán los mejores datos experimentales obtenidos de las actividades anteriores para realizar el inventario de ciclo de vida. Para la realización del análisis de ciclo de vida se utilizará el programa Simapro y el método ReCiPe (Goedkoop et al., 2009 Huijbregts et al., 2016), considerando los 18 indicadores de punto medio y 3 de punto final.

#### **5.7.3. Definición de objetivo y alcance**

#### 5.7.3.1. *Objetivo*

El objetivo del análisis del ciclo de vida fue evaluar los impactos ambientales de la generación de electricidad y productos secundarios a través de un modelo de biorrefinería a escala laboratorio a partir de RM y RVF.

#### 5.7.3.2. *Unidad funcional*

La unidad funcional fue la generación de 1 KWh de electricidad.

#### 5.7.3.3. *Límites del sistema*

De acuerdo con los resultados obtenidos experimentalmente y en bibliografía, a continuación, se describen los límites del sistema para el modelo de biorrefinería.

##### 5.7.3.3.1. *Residuos orgánicos*

El RM y los RVF fueron los principales recursos del modelo de biorrefinería. Los RVF al ser residuos provenientes de actividades humanas, no se consideraron emisiones directas e indirectas de gases de efecto invernadero ni consumo de energía en su generación. Para el RM aproximadamente el 80 % de la producción nacional se usa para alimentación de ganado (Hellin et al., 2013) y el 20% restante se desecha. Debido a lo anterior, la mejor combinación de los co-sustratos en el modelo de biorrefinería fue 75:25 RVF:RM, asumiendo el escenario con 25 % de rastrojo de maíz desechado. El transporte de los residuos al laboratorio no fu. Las emisiones de gases de efecto invernadero del acondicionamiento de los co-sustratos fueron tomadas en cuenta (Etapa de secado).

Los recursos secundarios tomados en cuenta fueron los siguientes: Agua (para la dilución del ácido catalizador de hidrólisis, dilución de los azúcares reductores y dilución de los ácidos orgánicos volátiles, así como el agua de lavado de los hidrolizados sólidos.), sales y compuestos (para medios minerales y buffer). No se tomaron en cuenta las emisiones dadas por el manejo de los inóculos (lodo anaerobio y cepa fotofermentativas), solamente se tomó en cuenta el pretratamiento del lodo anaerobio para la etapa de fermentación oscura.

##### 5.7.3.3.2. *Energía*

Se cuantificó el consumo de energía para cada una de las etapas de la biorrefinería (pretratamiento, fermentación), a partir de las etapas experimentales y datos de literatura. La generación de energía a partir del hidrógeno se las etapas de fermentación oscura y fotofermentación se calculó a partir de celdas de combustible

precedida de la etapa de purificación con una eficiencia de conversión y purificación de (Buscar datos). El metano producido en la etapa de digestión anaerobia fue transformado a electricidad por medio de una planta de ciclo combinado con eficiencias de generación de electricidad y calor de (Buscar datos).

#### 5.7.3.3.3. *Productos*

Los principales productos secundarios fueron sin acondicionamiento:

- Biosólido de fermentación oscura y digestión anaerobia: mejorador de suelo en cultivos alimenticios.
- Aguas de lavado de hidrolizados sólidos: (Complementar)
- Fermentado líquido de fotofermentación: Complemento nutricional en la fabricación de concentrado animal.

El tratamiento de los productos secundarios no fue considerado, simplemente se realizó la cuantificación de su posible reemplazo de materias primas.

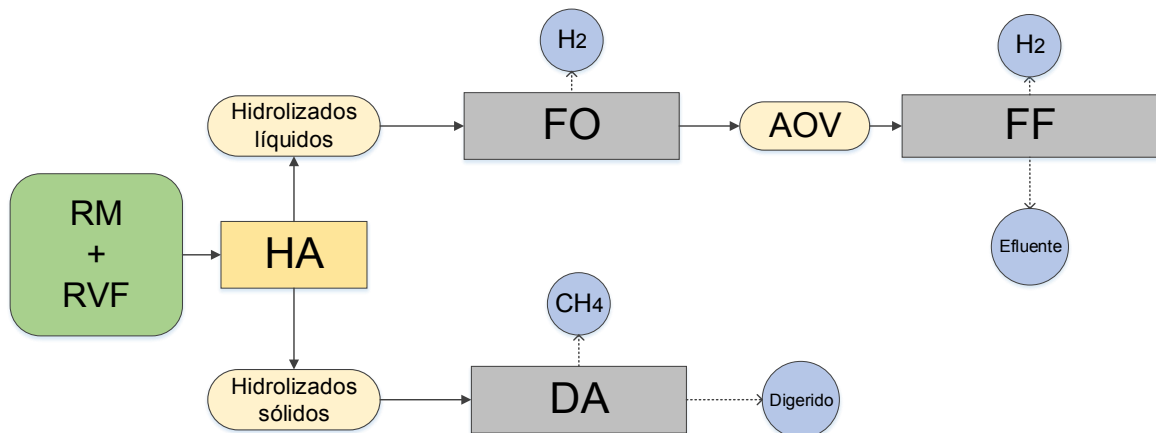
#### 5.7.4. *Análisis de inventarios de ciclo de vida*

**ACTUALMENTE EN DESARROLLO**

#### 5.7.5. *Evaluación de impactos de ciclo de vida*

**ACTUALMENTE EN DESARROLLO**

Todo el desarrollo experimental se realizó siguiendo el esquema representado en la Figura 6.



**Figura 6. Esquema de biorrefinería para la producción de hidrógeno y metano.**

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Actividad 1. Caracterización de los co-sustratos.

Los RVF recolectados en la División de Estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL fueron caracterizados antes de su homogenización y secado. La Tabla 19 describe la composición (%) de RVF.

**Tabla 19. Composición de los RVF**

Residuo	% peso
Cáscaras de papaya	16.95
Cáscaras de calabaza	15.57
Cáscaras de papa	17.67
Tallos de espinaca	20.26
Tallos de cilantro	6.71
Cáscaras de pepino	5.72
Cáscaras de melón	10.20
Manzana	6.92

La Tabla 20 muestra la caracterización fisicoquímica de los co-sustratos orgánicos usados. Los RVF muestran un pH inferior a 6 debido a la degradación previa a la que fueron expuestos antes del secado y por el contenido de AOV presentes. Los sólidos volátiles representan la materia orgánica aprovechable y en los dos co-sustratos su valor supera el 85% en base seca.

**Tabla 20. Caracterización fisicoquímica de residuos orgánicos**

Parámetro	RVF	RM
pH	5.52	7.54
Humedad (%bh)	89.81 ± 0.28	5.41 ± 0.17
Sólidos totales (%bh)	10.19 ± 0.28	94.59 ± 0.17
Sólidos volátiles (%bs)	87.66 ± 0.42	89.78 ± 0.16
Cenizas (%bs)	12.34 ± 0.42	10.22 ± 0.16
Alcalinidad (g CaCO <sub>3</sub> / kg <sub>bs</sub> )	57 ± 4.24	54 ± 5.09
Ácidos orgánicos volátiles (g AOV/ kg <sub>bs</sub> )	68.4 ± 5.09	50.4 ± 0.0
Celulosa (%bs)	12.8 ± 0.99	33.25 ± 0.494
Hemicelulosa (%bs)	23.4 ± 0.88	24.35 ± 0.79
Lignina (%bs)	10.26 ± 1.01	24.74 ± 0.486
Proteínas (%bs) <sup>a</sup>	12.63 ± 1.46	3.25 ± 0.70
C (%bs)	51.69	43.84
H (%bs)	3.43	15.74
O (%bs)	42.69	39.97
N (%bs)	2.19	0.45
Poder calorífico (cal/g <sub>bs</sub> )	2712	3606

Nota: <sup>a</sup> Valores obtenidos de promediar las proteínas calculadas a partir del producto del % de N o NTK con el factor de Jones 6.25 (Mariotti et al., 2008)

El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en los co-sustratos es variable debido a las variaciones estructurales. Los RVF principalmente fueron cáscaras, razón por la que el contenido de lignina es bajo, sin embargo, contienen un 36.2 % de carbohidratos disponibles. El contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina se encuentran en los intervalos presentados en la literatura; 12-43 % para celulosa, 10-24 % para hemicelulosa y 8-17% para lignina (Campuzano et al., 2015; Gunaseelan et al., 2007; Nawirska et al., 2005). El contenido de proteína en la FORSU se encuentra entre 3 y 27 % debido a que contienen algunos residuos cárnicos que aportan proteína (Lopez et al., 2016). Para algunas mezclas de frutas y verduras se han encontrado contenidos proteicos similares e inferiores al valor obtenido en esta investigación 13.12 % (Bouallagui et al., 2009), 6.87 % (Alvarez et al., 2008).

Debido a su estructura, el RM presentó mayor contenido de lignina y el contenido de celulosa y hemicelulosa se encuentra entre el 32-47 % y el 19-27% respectivamente (Ren et al., 2011). El uso de RAL como fuente de alimento para animales se ha limitado debido al alto contenido de fibra y bajo contenido de proteína. Es el caso del rastrojo de maíz que los contenidos proteicos oscilan entre el 2 y el 7% (H. Y. Li et al., 2014).

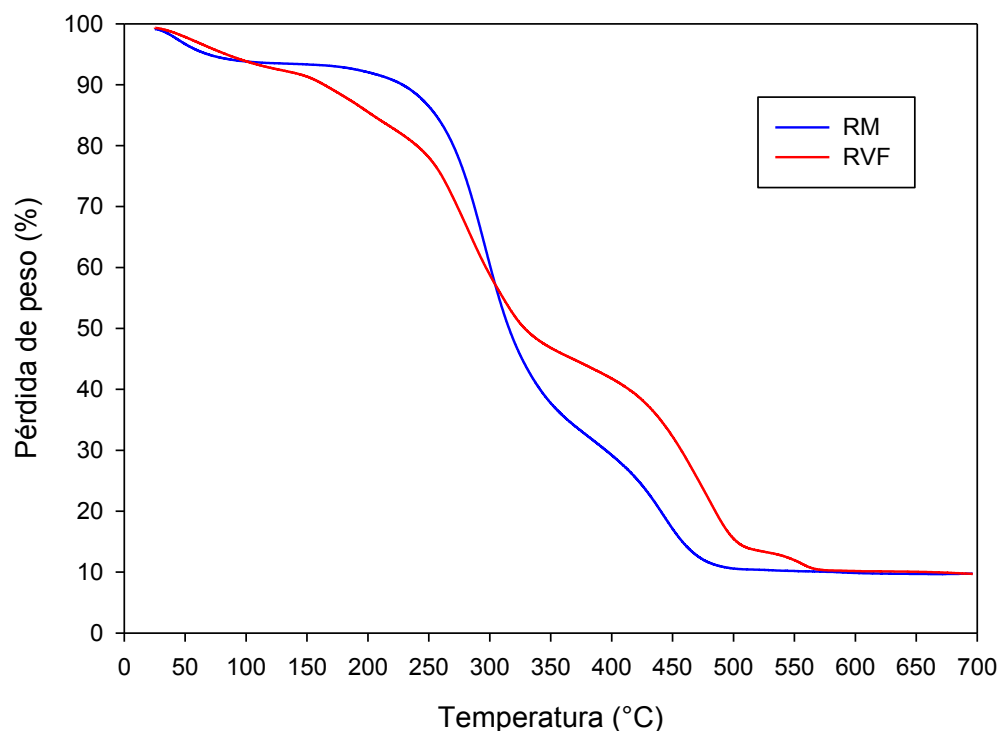
De acuerdo al análisis elemental de los co-sustratos se realizó la determinación de las fórmulas moleculares empíricas. Las fórmulas moleculares empíricas se pueden ver en la Tabla 21.

**Tabla 21. Fórmula molecular empírica de co-sustratos**

<b>Sustrato</b>	<b>Fórmula molecular empírica</b>	<b>Peso molecular empírico (g/mol)</b>
RM	$C_{113.66}H_{489.69}O_{77.72}N$	3111.11
RVF	$C_{27.54}H_{21.93}O_{17.06}N$	639.27

Tanto el RM como los RVF presentan eventos térmicos de pérdida de peso según se ve en la Figura 7. El primer evento térmico se presenta antes de los 100 °C y se debe a la evaporación del agua presente en los co-sustratos, ya que el secado se realizó a 85 °C. El RM presenta mayor estabilidad térmica comparado con los RVF debido a que su degradación inicia después de los 200 °C; esta estabilidad es atribuida al mayor contenido de carbohidratos estructurales (Gani et al., 2007). Después de los 200 °C el RM presentó 2 eventos térmicos con una pérdida de cerca de 80 % de peso;

esta pérdida se atribuye descomposición de la hemicelulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas (X. He et al., 2018).



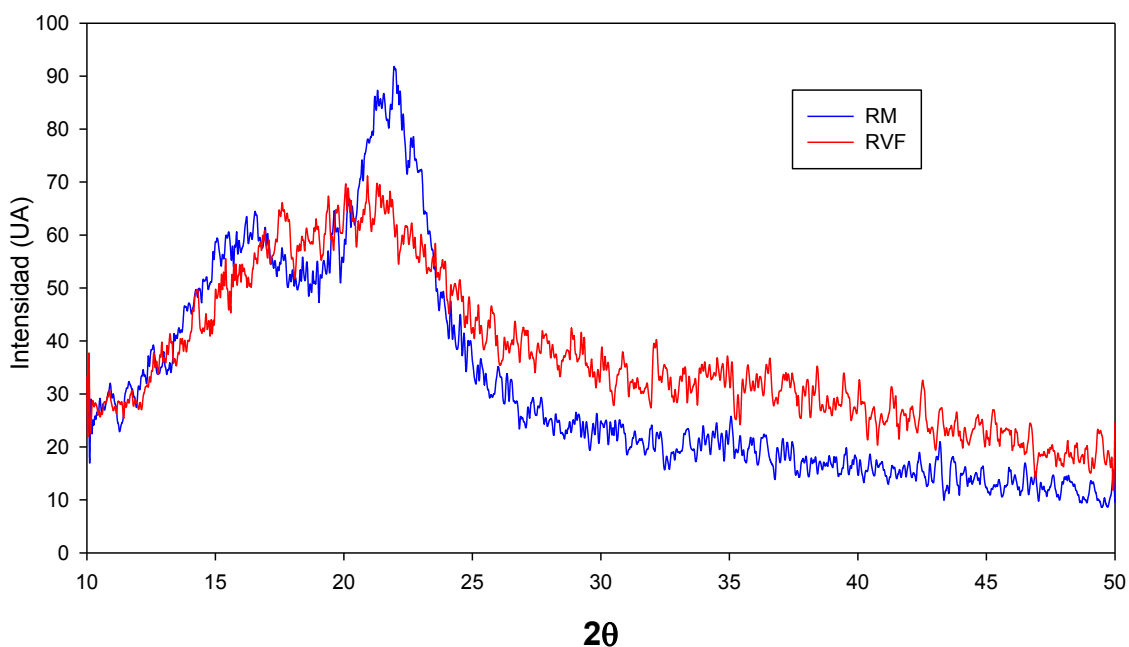
**Figura 7. Análisis termogravimétrico de co-sustratos**

Después del evento térmico de evaporación del agua presente en los RVF (<100 °C) se presenta la pérdida de peso por la descomposición de extractivos (pectina, terpenos, taninos, AOV, aceites no cuantificados en esta investigación). El intervalo descomposición de extractivos se ha reportado entre los 100 y los 250 °C (Manals et al., 2011), siendo la pérdida de peso en este análisis de cerca de 15 %. A partir de los 250 °C se presentan tres pérdidas importantes de peso de cerca del 70 que se atribuyen a la descomposición de la celulosa, hemicelulosa, lignina y fibras presentes en los RVF (Molinuevo et al., 2013). En concordancia con el análisis de sólidos (Tabla 20), el contenido de cenizas es similar al porcentaje presentado por el análisis termogravimétrico que es cercano al 10 %.

El análisis de DRX fue realizado para evaluar la cristalinidad de los co-sustratos. De acuerdo con Zhang. Yi et al, (2004) la celulosa posee estructura cristalina en comparación con la celulosa y lignina; el carácter cristalino se debe a la interacción de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals entre las moléculas adyacentes. En la Figura 8 se observan los difractogramas de rayos X de los co-



sustratos. El RM presenta una estructura cristalina que se debe a la presencia de la celulosa; al contrario, los RVF presenta una estructura completamente amorfa ya que no se pueden distinguir los picos de difracción cristalina de la celulosa que se presenta en  $2\theta = 22^\circ$ .



**Figura 8. Difractogramas de rayos X de los co-sustratos**

El índice de cristalinidad ICr fue determinado con la ecuación 4 y se presenta en la Tabla 22 junto con el ICr de otros residuos orgánicos.

**Tabla 22. Comparación del ICr de diferentes residuos orgánicos**

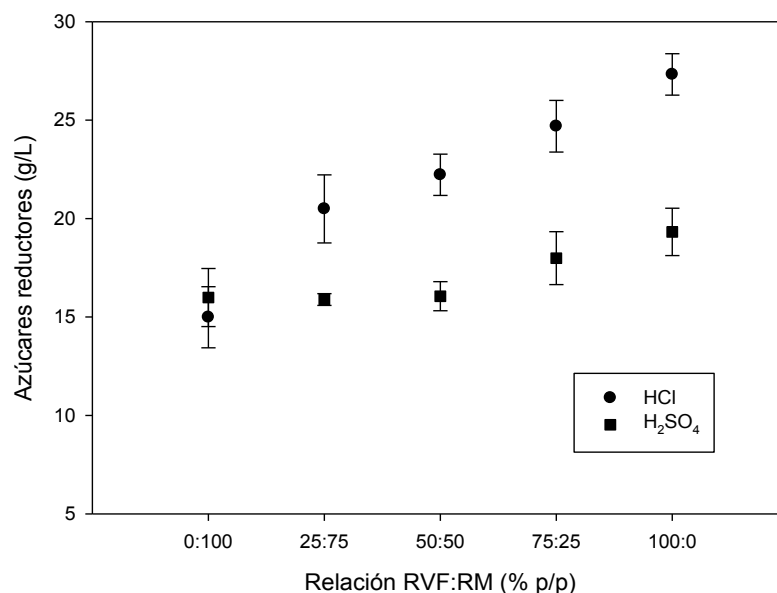
Residuo	$I_{002}$	$I_{am}$	ICr (%)	Ref
RM	91.72	61.22	33.25	Este estudio
RVF	69.51	59.78	14.00	Este estudio
Cascarilla de arroz	NR	NR	46.8	1
Rastrojo de maíz	NR	NR	37.6	2
Rastrojo de maíz	10982	6426	41.47	3
Residuos de vegetales	14.3	8.7	39.16	4

Referencia:1, Johar et al. (2012); 2, Fu et al. (2015), 3, H. Li et al. (2013); 4, Thulluri et al. (2013).

Nota: NR: No reportado.

## 6.2. Actividad 2. Hidrólisis ácida de co-sustratos orgánicos (RM y RVF)

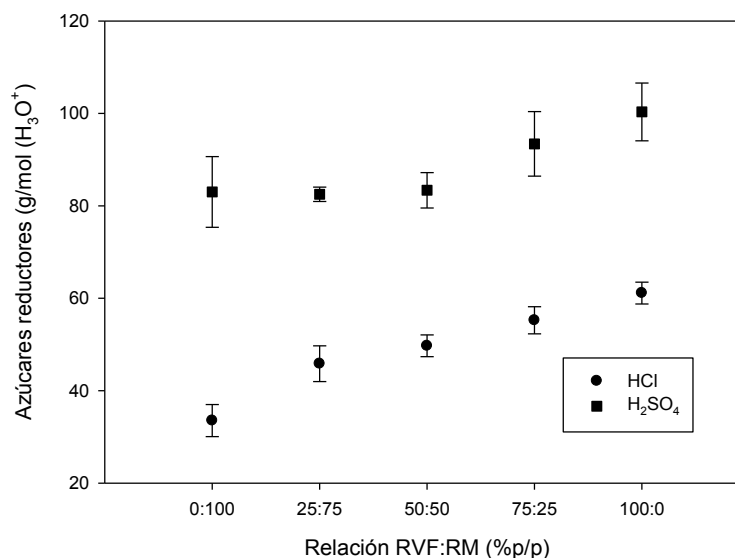
Las concentraciones máximas del diseño de experimentos se encontraron en la relación 100:0 RVF:RM, con valores de  $19.32 \pm 1.21$  g dextrosa/L y  $27.32 \pm 1.05$  g dextrosa/L para el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y el  $\text{HCl}$  respectivamente (Figura 9). Este mejor resultado puede ser consecuencia de una mayor digestibilidad de los RVF (único constituyente de este ensayo) que de los RM, pues presentan un arreglo estructural diferente y un menor contenido de lignina que los residuos lignocelulósicos (Herrera, 2016; Sluiter et al., 2010; VALORGAS, 2011); por lo tanto los procesos de degradación son más extensivos facilitando así la recuperación de los carbohidratos estructurales (Gunaseelan, 2004). De acuerdo con lo anterior, un mayor contenido del co-sustrato RM en la mezcla RVF:RM disminuye la concentración de azúcares reductores.



**Figura 9. Concentración de azúcares reductores (CAR) con respecto a la relación de combinación RVF:RM para cada ácido catalizador**

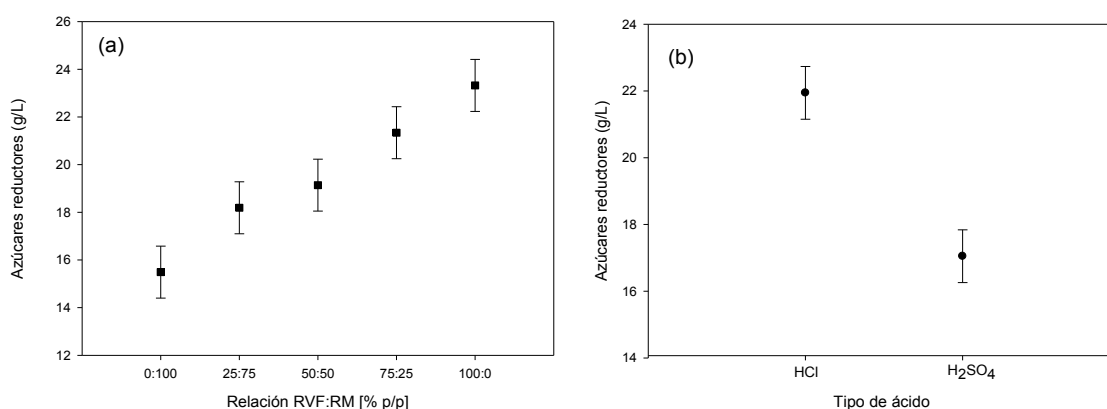
Las mayores concentraciones de azúcares reductores obtenidas para la combinación de los co-sustratos fueron de  $24.69 \pm 1.31$  g dextrosa/L y  $17.99 \pm 1.35$  g dextrosa/L para el  $\text{HCl}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  respectivamente, en la relación 75:25 RVF:RM, lo cual concuerda con lo discutido previamente. Utilizando el  $\text{HCl}$  0.5% (v/v) se obtuvieron los mejores resultados para las combinaciones RVF:RM 25:75 hasta 100:0, lo que pudo estar influenciado por la concentración de sus iones hidronio, 2.32 veces superior a la concentración de los del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.5% (v/v). La variación en la concentración de iones

hidronio afecta la eficiencia de la hidrólisis, evento descrito por Hilpmann et al, (2014), donde concentraciones de iones inferiores a 0.1 presentaron eficiencias menores a 5 %, mientras que con concentraciones superiores a 0.1 se alcanzan eficiencias del 100%. Por otro lado el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  es el más comúnmente utilizado en procesos de hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos debido a que tiene dos protones  $[\text{H}^+]$  disponibles para la hidrólisis en comparación del  $\text{HCl}$  que solo tiene un protón (Hutomo et al., 2015), además es menos corrosivo comparado con otros ácidos como el  $\text{HCl}$  o el  $\text{HNO}_3$  (Argun et al., 2016). La actividad de los iones hidronio del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  fue superior a los del  $\text{HCl}$ , alcanzando un rendimiento de  $100.33 \pm 6.26$  g dextrosa/mol de ion hidronio en la relación 100:0 RVF:RM, siendo el rendimiento para el  $\text{HCl}$  de  $61.13 \pm 6.26$  g dextrosa/ mol de ion hidronio para la misma relación RVF:RM (Figura 10). Si bien, los rendimientos del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por mol de ion hidronio fueron superiores, las mayores concentraciones de azúcares reductores se encontraron para el  $\text{HCl}$ . También se ha encontrado que el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  promueve la degradación de los carbohidratos hidrolizados y su conversión en compuestos inhibitorios como el 5-hidroximetilfurfural, así como la liberación de ácido acético y la degradación de la lignina en compuestos fenólicos que también tienen efectos negativos sobre los cultivos microbianos (Gonzales et al., 2016; Hutomo et al., 2015).



**Figura 10. Concentración de azúcares reductores (CAR) por mol de iones hidronio de cada relación de combinación RVF:RM para cada ácido catalizador.**

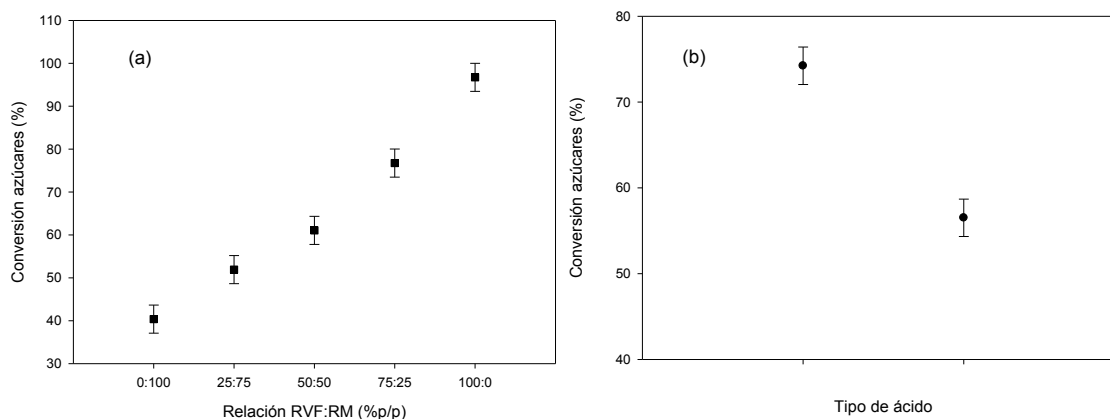
Los efectos principales de la relación RVF:RM y del tipo de ácido se muestran en la Figura 11. Los valores de los efectos resultaron del promedio de la concentración para cada tipo de ácido y del promedio para cada relación RVF:RM (Montgomery, 2004). Del análisis de varianza para esta respuesta, se obtuvo que el modelo, los efectos de la relación de co-sustratos y el tipo de ácido fueron significativos. El coeficiente de determinación  $R^2$  fue 0.8648 y el coeficiente de determinación ajustado fue 0.8040 (ANEXO F). Para las relaciones RVF:RM se corrobora que a mayor contenido de RM la concentración de azúcares reductores es menor y que el HCl permite obtener una concentración mayor de azúcares reductores.



**Figura 11. Efectos principales en la CAR (a) Relación RVF:RM, (b) tipo de ácido.**

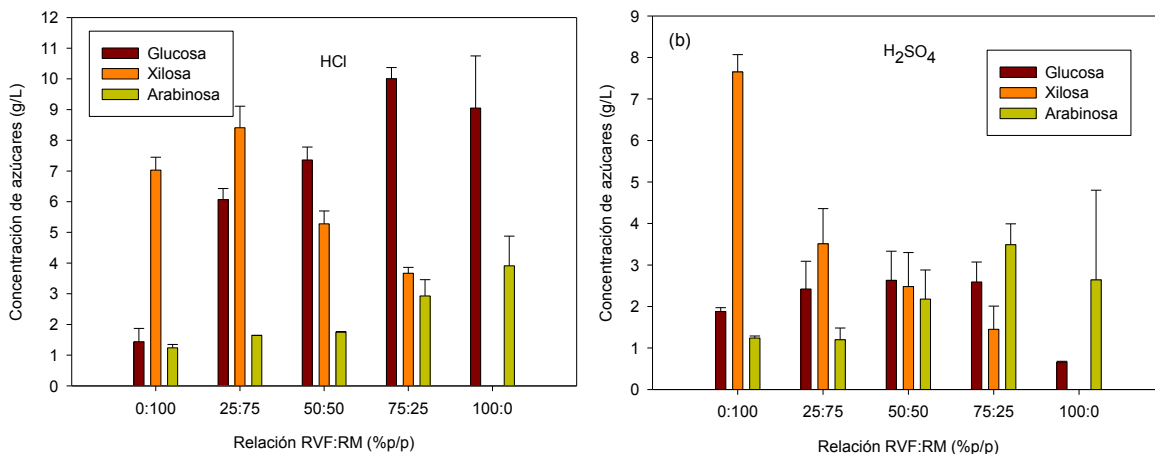
La eficiencia de la conversión de holocelulosa en azúcares reductores se determinó comparando las concentraciones experimentales con respecto a los valores teóricos esperados. Los valores teóricos esperados se calcularon con el valor de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) de cada uno de los sustratos y la fracción de RVF y RM alimentados a cada uno de los experimentos. El porcentaje de holocelulosa en los RVF y el RM fue de 36.2% y 57.6 % en base seca respectivamente. La máxima conversión de azúcares reductores promedio fue de  $96.74 \pm 3.27$  %, este valor es para la relación 100:0 RVF:RM corroborando lo mencionado anteriormente sobre la fácil degradación de la fracción vegetal y de frutas; los efectos principales en la conversión de azúcares reductores se pueden ver en la Figura 12. De acuerdo al análisis de varianza para la conversión de azúcares reductores, la relación de co-sustratos y el tipo de ácido resultaron ser significativos (ANEXO G). Los valores del coeficiente de determinación  $R^2$  y coeficiente de determinación ajustado  $R^2_{aj}$  fueron de 0.9591 y 0.9407 respectivamente. Cabe resaltar que a mayor contenido de RVF, la conversión

de azúcares reductores aumentó. Con HCl la conversión de azúcares reductores fue superior a la obtenida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 12b).



**Figura 12. Efectos principales en la conversión de azúcares reductores (a) Relación RVF:RM, (b) tipo de ácido.**

A partir del análisis de las muestras por HPLC (Figura 13) se determinó que la mayor concentración de glucosa fue  $10.02 \pm 0.36$  g/L, concentración que correspondió a la relación RVF:RM 75:25 para el HCl como catalizador, siendo este valor importante ya que es la principal fuente de carbono para los microorganismos (Pattra et al., 2008). Cuando aumentó el contenido de RM la concentración de glucosa disminuyó, llegando hasta un valor de  $1.44 \pm 0.43$  g/L en la relación 0:100 para el mejor catalizador. Se ha propuesto que para extraer mayores concentraciones de azúcares fermentables de los compuestos lignocelulósicos, se requiere que las condiciones de hidrólisis sean más severas (Gonzales et al., 2016); sin embargo, esto genera también mayor generación de productos inhibidores para los microorganismos.



**Figura 13. Composición de azúcares en los hidrolizados líquidos por HPLC**

Considerando que la xilosa es el principal azúcar de la hemicelulosa, para la relación 0:100 RVF:RM se obtuvieron altas concentraciones de xilosa con HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizadores ( $7.03 \pm 0.41$  y  $7.65 \pm 0.42$  g/L, respectivamente). De las relaciones evaluadas, las que tienen mayor contenido de RM, tuvieron valores elevados de xilosa; debido a esto, la hidrólisis de la hemicelulosa fue favorecida por el contenido de RM, ya que la celulosa presenta una estructura más rígida (Moniz et al., 2013). Investigaciones como las de Zu et al, (2014) y G. Cao et al, (2009), quienes evaluaron la hidrólisis de RM con HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizadores, también encontraron concentraciones de xilosa superiores a las de glucosa (20.44 g/L y 6.25 g/L respectivamente); debido a que la hemicelulosa es fácilmente solubilizada comparada con la celulosa.

Debido a las condiciones de hidrólisis ácida, otros compuestos secundarios se formaron durante el tiempo de hidrólisis, estos se relacionan en la Tabla 23. La concentración de estos compuestos fue variable y se encuentran entre los siguientes rangos (g/L): 0.138-1.160, 0.131-0.208, 0.571-1.114, 3.096-6.589, 0.447-0.788, 0.746-4.266, 0.159-0.210 y 0.165-3.063 para el HMF, furfural, compuestos fenólicos totales, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido láctico respectivamente. La presencia de estos compuestos en los hidrolizados líquidos es un indicativo de la descomposición de la glucosa, xilosa (Hilpmann et al., 2014; Hongqiang et al., 2008).

Para el HMF, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido láctico las mayores concentraciones se encontraron para la combinación 100:0 y los dos ácidos catalizadores y para el furfural, la máxima concentración se obtuvo en la

combinación 25:75 con HCl. De los azúcares cuantificados por cromatografía, no se observa presencia de xilosa en la relación 100:0, probablemente debido a su degradación en furfural y posteriormente en ácido fórmico y ácido láctico y ácido succínico, tanto para el HCl como para el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Giuliano et al., 2016; Möller et al., 2013).

De manera similar a la degradación de la xilosa, la glucosa se degrada a HMF y si las condiciones son severas, el HMF se degrada en ácido fórmico, ácido acético y ácido láctico (Min et al., 2016). Debido a lo mencionado anteriormente y a los resultados presentados en la Tabla 23, el furfural y el HMF formados en la hidrólisis ácida de los co-sustratos sufrieron una descomposición posterior al igual que el ácido láctico, ya que por medio de hidrólisis ácida se puede formar ácido acético y ácido propiónico (Neureiter et al., 2004).

**Tabla 23. Compuestos secundarios de hidrólisis ácida.**

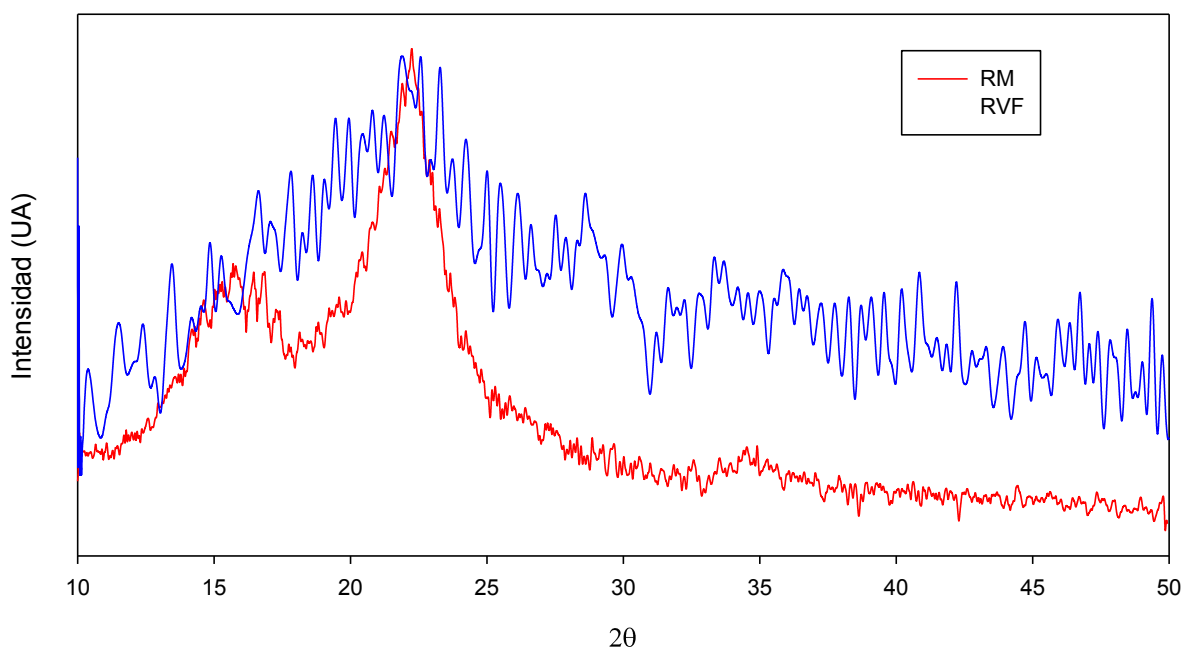
<b>Relación RVF:RM (%) p/p)</b>	<b>HMF (g/L)</b>	<b>Furfural (g/L)</b>	<b>Compuestos fenólicos totales (g/L)</b>	<b>Ácido fórmico (g/L)</b>	<b>Ácido acético (g/L)</b>	<b>Ácido propiónico (g/L)</b>	<b>Ácido succínico (g/L)</b>	<b>Ácido láctico (g/L)</b>
0:100 HCl	0.138 ±0.002	0.143 ±0.003	0.627 ±0.011	6.131 ±0.071	0.742 ±0.157	0.864 ±0.000	0.175 ± 0.001	0.181 ±0.032
0:100 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.154 ±0.000	0.170 ±0.001	0.578 ±0.022	5.799 ±0.490	0.772 ±0.078	0.746 ± 0.431	0.171 ±0.002	0.165 ±0.004
25:75 HCl	0.469 ±0.020	0.208 ±0.008	0.788 ±0.019	5.369 ±0.303	0.835 ±0.239	1.092 ±0.445	0.170 ±0.009	0.833 ±0.241
25:75 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.266 ±0.057	0.139 ±0.009	0.571 ±0.112	3.096 ±0.861	0.447 ±0.089	0.762 ± 0.212	0.160 ±0.006	0.541 ±0.123
50:50 HCl	0.149 ±0.126	0.172 ±0.002	0.769 ±0.016	3.422 ±0.872	0.513 ±0.090	1.049 ±0.339	0.159 ±0.005	0.568 ± 0.492
50:50 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.447 ±0.037	0.143 ±0.010	0.650 ±0.020	4.285 ±0.436	0.461 ±0.072	1.644 ±0.152	0.166 ±0.002	1.151 ±0.090
75:25 HCl	0.654 ±0.015	0.138 ±0.001	0.898 ±0.037	4.017 ±0.152	0.532 ±0.012	1.803 ± 0.059	0.163 ±0.002	1.394 ±0.046
75:25 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.558 ±0.013	0.131 ±0.000	0.826 ±0.122	3.826 ±0.381	0.478 ±0.030	2.097 ±0.225	0.165 ±0.003	1.428 ±0.168
100:0 HCl	1.160 ±0.012	0.149 ±0.008	1.114 ±0.034	6.296 ±0.724	0.788 ±0.117	3.780 ±0.371	0.210 ±0.009	2.985 ±0.304
100:0 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.850 ±0.137	0.140 ±0.008	0.871 ±0.008	6.589 ±0.575	0.771 ±0.189	4.266 ±0.282	0.210 ±0.009	3.063 ±0.531



La producción de compuestos inhibidores en procesos de hidrólisis ácida se pueden separar en tres grupos principales: ácidos débiles, derivados de furano y compuestos fenólicos (Hongqiang et al., 2008). Los compuestos fenólicos específicamente son derivados de la descomposición de la lignina y pueden ser tóxicos en procesos fermentativos ya que por su bajo tamaño molecular pueden penetrar la membrana celular e inhibir el crecimiento (Brown et al., 2014; Klinke et al., 2004). La relación 100:0 HCl presentó una concentración de  $1.114 \pm 0.034$  g/L de compuestos fenólicos totales, siendo este valor el mayor de todo el diseño de experimento.

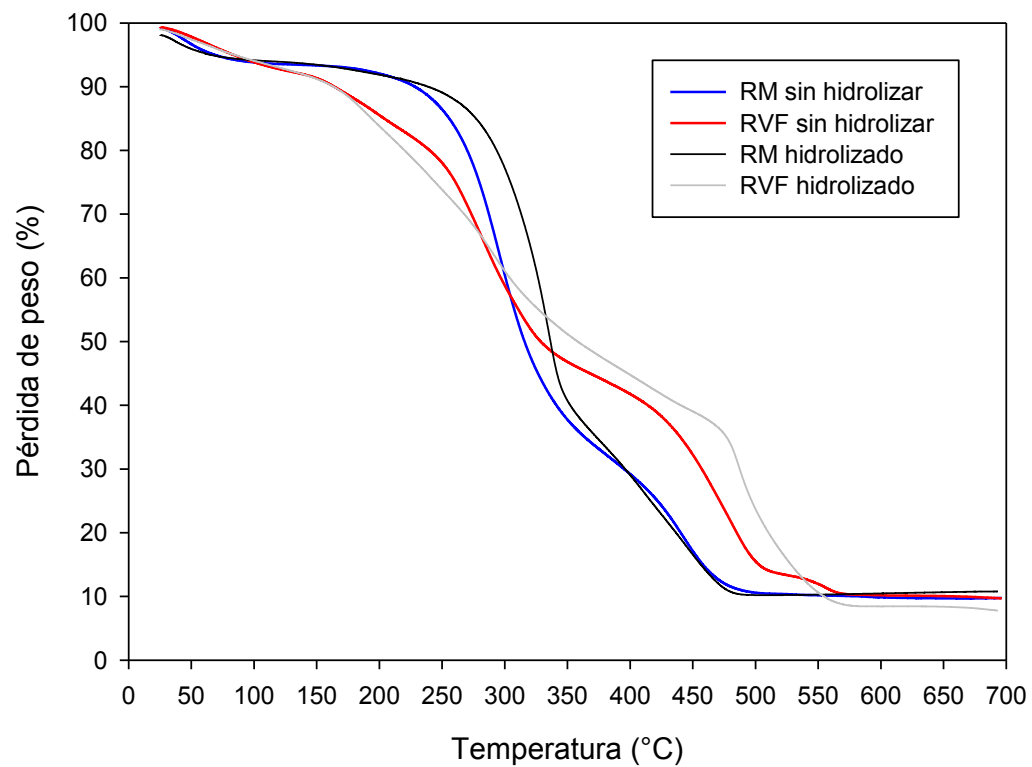
De acuerdo con las concentraciones de los compuestos inhibitorios, se hace necesario realizar un pretratamiento para evitar la inhibición en procesos fermentativos. Se han reportado diferentes concentraciones que han afectado bioprocesos como la FO usando hidrolizados ácidos líquidos de compuestos orgánicos. Es el caso de G. Kumar et al. (2014) quienes encontraron que con concentraciones de 0.69 g/L de HMF 12 g/L de ácido fórmico se inhibe el crecimiento y la producción de hidrógeno por medio de la FO. Caso contrario de Zheng et al. (2013) quienes reportan que a concentraciones de 4 g/L de HMF o furfural y 6 g/L de ácido acético existe inhibición en el metabolismo microbiano. Sin embargo tener concentraciones iniciales de HMF superiores a 1 g/L reduce el rendimiento en la producción de hidrógeno a partir de hidrolizados (Gonzales et al., 2016; Zyi et al., 1991). Si bien, las concentraciones de compuestos fenólicos totales fueron inferiores a 1 g/L excepto en la combinación 100:0 HCl, no tendrían algún efecto significativo en la reducción del rendimiento en la producción de hidrogeno ya que a concentraciones de 1 g/L el impacto en el rendimiento no es tan notorio comparado con las concentraciones de HMF y furfural (Quéméneur et al., 2012).

La Figura 14 muestra la difracción de rayos X realizada a los hidrolizados sólidos como parámetro de caracterización de los hidrolizados sólidos. Los hidrolizados ácidos sólidos de RVF presentan una estructura totalmente amorfa de la cual no se pueden distinguir el pico cristalino ( $2\theta=22^\circ$ ) debido a la desnaturalización de los carbohidratos por la hidrólisis ácida aplicada. En cuanto al RM, la intensidad del pico cristalino de la región amorfa disminuye debido a que en el pretratamiento de hidrólisis ácida, se desintegró en mayor parte la hemicelulosa quien es el principal componente de la parte amorfa de los compuestos lignocelulósicos (Johar et al., 2012); razón por la cual el ICr pasó de 33.25% del RM sin hidrólisis a 59.06% en el RM hidrolizado.



**Figura 14. Difractograma de rayos X de los hidrolizados sólidos.**

El RM hidrolizado es más estable térmicamente comparado con el RM si hidrolizar debido a que la desintegración de los carbohidratos estructurales después de la hidrólisis (celulosa y lignina) requiere más energía para llevarse a cabo (Johar et al., 2012), esto se puede observar en la Figura 15. El RM hidrolizado presentó 3 eventos térmicos, el primero concuerda con lo descrito anteriormente con la evaporación del agua y los dos siguientes con la desintegración de la celulosa y la lignina. Parte de la celulosa y hemicelulosa se degradó a sus correspondientes monómeros durante el pretratamiento de hidrólisis ácida de los RVF, de acuerdo con esto, los 4 eventos térmicos presentes en los RVF hidrolizados corresponden a la desintegración de las moléculas de agua, extractivos, celulosa y hemicelulosa remanente y lignina.



**Figura 15. Comparación de estabilidad térmica de co-sustratos**

### 6.3. Actividad 3. Producción de hidrógeno por fermentación oscura con hidrolizados ácidos líquidos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la hidrólisis ácida de los co-sustratos, la combinación que obtuvo mayores azúcares fermentables en términos de azúcares reductores como en azúcares monoméricos fue la relación 75:25 RVF:RM con HCl como ácido catalizador. Se realizó el escalamiento de hidrólisis en botellas serológicas en autoclave como se menciona en la sección 5.3.5. Se realizó el tratamiento de limado (overliming) a los hidrolizados ácidos descrito en la sección 5.4.4.2 y la comparación entre los hidrolizados sin tratamiento y con el tratamiento en cuanto a los azúcares reductores, azúcares monoméricos y compuestos fenólicos totales se pueden ver en la Tabla 24.

**Tabla 24. Caracterización de hidrolizados líquidos en el escalamiento de la hidrólisis ácida**

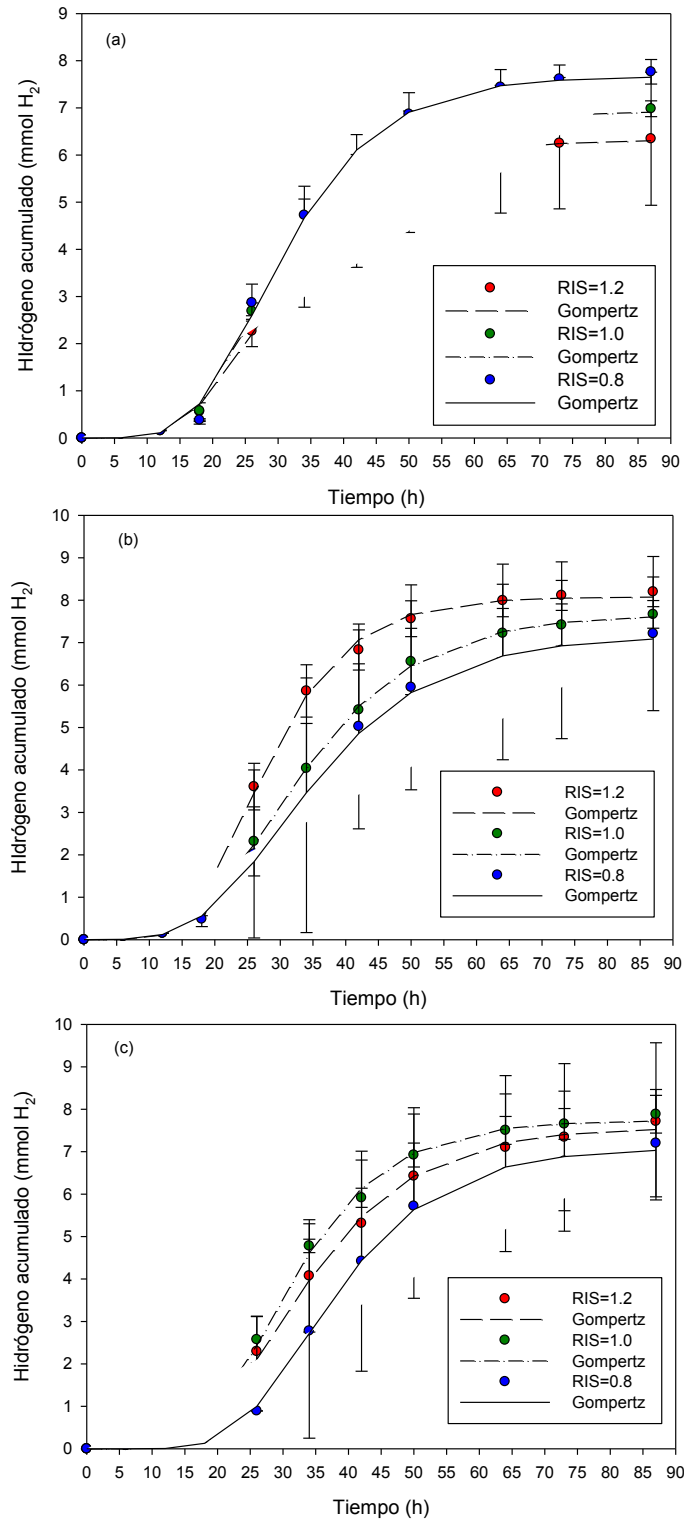
Combinación	CAR (g/L)	Azúcares monoméricos (g/L)	Compuestos fenólicos totales (g/L)
75:25 sin tratamiento	24.00 ±0.720	G=3.42 X=10.53 A=1.17	1.064 ±0.00
75:25 con tratamiento	21.19 ±0.245	G=Pendiente X=Pendiente A=Pendiente	0.776 ±0.002

Nota: G, glucosa; X, xilosa; A, arabinosa; CAR, concentración de azúcares reductores

Con el tratamiento de limado realizado se hizo una reducción del 11.71% en los azúcares reductores y un 27.07% de compuestos fenólicos totales. El cambio en la concentración de azúcares reductores fue menos drástico y se puede comparar con la reducción del 9.1% en los azúcares reductores presentada por Chang et al, (2011a) en el tratamiento de hidrolizados ácidos de cascarilla de arroz utilizando HCl como ácido catalizador. De acuerdo con Larsson et al, (1999) se pueden alcanzar reducciones del 20% en la concentración de HMF y compuestos fenólicos totales con el tratamiento de limado en hidrolizados ácidos sin afectar la concentración de algunos ácidos orgánicos presentes, lo cual se compara con la reducción de los compuestos fenólicos totales en esta investigación.

La producción acumulada de hidrógeno en los experimentos de fermentación oscura (FO) con respecto a la concentración de azúcares reductores (CAR) y la relación inóculo sustrato (RIS) se puede ver en la Figura 16. La CAR en la Figura 16 (a), (b) y (c) fueron 10, 13 y 16 g/L respectivamente. Para la CAR de 10 g/L la máxima

producción acumulada de  $H_2$  se dio a una RIS de 0.8 (Figura 16(a)), por el contrario, cuando la CAR fue de 13 g/L y 16 g/L la máxima producción de  $H_2$  se presentó a una RIS de 1.2 (Figura 16(b)) y 1.0 (Figura 16(c)) respectivamente.



**Figura 16. Producción de hidrógeno acumulado y ajuste de la ecuación de Gompertz modificada con respecto a la concentración de azúcares reductores. (a) CAR=10 g/L, (b) CAR=13 g/L, (c) CAR=16 g/L**

La mayor variación y la menor producción de  $H_2$  entre los tratamientos se presentó a la RIS de 0.8 y 1.0 a CAR de 13 y 16 g/L debido a una posible inhibición por sustrato, ya que a valores bajos de RIS la cantidad de sustrato es mayor y la cantidad de microorganismos presentes es menor (Fangkum et al., 2011). La producción máxima en todo el diseño de experimentos se fue de 8.08 mmol de  $H_2$  la cual se presentó a una RIS de 1.2 y una concentración de 13 g/L de azúcares reductores (Tabla 26).

**Tabla 25. Constantes de la ecuación de Gompertz del diseño experimental 3<sup>2</sup> de FO**

Experimento (CAR:RIS)	$H_{\max}$ (mmol $H_2$ )	$R_{\max}$ (mmol $H_2/h$ )	$\lambda$ (h)	$R^2$
10-1.2	6.33	0.21	15.78	0.99
13-1.2	8.08	0.34	15.93	0.99
16-1.2	7.58	0.24	17.21	0.99
10-1.0	6.93	0.24	15.61	0.99
13-1.0	7.70	0.23	16.33	0.99
16-1.0	7.74	0.29	17.52	0.99
10-0.8	7.68	0.27	16.55	0.99
13-0.8	6.98	0.21	17.17	0.99
16-0.8	7.22	0.23	22.33	0.99

Debido a la baja cantidad de inóculo y una alta cantidad de sustrato, el experimento con CAR= 16 y RIS=0.8 presentó el mayor tiempo lag ( $\lambda$ = 22.33) debido a la adaptación de los microorganismos productores de hidrógeno al sustrato (Chang et al., 2011c). La máxima tasa de producción de hidrógeno fue de 0.34 mmol  $H_2/h$  y se presentó en el experimento CAR=13-RIS=1.2. Debido al ruido presentado por la variación en las unidades experimentales, el modelo, los efectos principales y de interacción no son representativos (Tabla 25).

**Tabla 26. ANOVA de diseño de experimento 3<sup>2</sup> de FO.**

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Valor p
Modelo	4.663	8	0.582	0.533	0.8059
A-CAR	1.313	2	0.656	0.600	0.5690
B-RIS	0.086	2	0.043	0.039	0.9614
AB	3.263	4	0.815	0.746	0.5845
Error	9.840	9	1.093		
Total	14.503	17			

Al finalizar la fermentación se realizó la caracterización del efluente con el objetivo de determinar los principales AOV producidos, esta caracterización junto al % de consumo de azúcares reductores y el pH final de fermentación se muestra en la Tabla 27.

**Tabla 27. Concentración de metabolitos secundarios en la fermentación oscura.**

Experimento (CAR:RIS)	pH final	Etanol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Consumo de azúcares reductores (%)	$Y_{H_2}$ (mmol H <sub>2</sub> /g azúcar reductor)
10-1.2	6.02 ±0.12	0.06 ±0.01	2.30 ±0.13	0.29 ±0.02	4.34 ±0.46	95.36 ±0.43	9.06
13-1.2	5.94 ±0.02	0.06 ±0.00	2.42 ±0.25	0.41 ±0.17	5.29 ±0.59	96.33 ±0.49	8.85
16-1.2	5.25 ± 0.11	0.05 ±0.03	1.30 ±0.11	0.13 ±0.05	1.61 ±0.52	80.38 ±12.51	6.68
10-1.0	5.96 ±0.06	0.04 ±0.01	1.92 ± 0.08	0.29 ±0.12	3.78 ±0.84	95.27 ±0.44	9.61
13-1.0	5.90 ±0.05	0.05 ±0.02	2.01 ±0.32	0.27 ±0.02	5.09 ±0.45	95.94 ±0.16	8.41
16-1.0	5.26 ±0.13	0.07 ±0.00	2.00 ±0.16	0.12 ±0.03	3.16 ±1.39	78.04 ±10.52	6.90
10-0.8	5.71 ±0.02	0.13 ±0.11	2.10 ±0.25	0.36 ±0.05	3.61 ±0.48	95.33 ±0.28	10.84
13-0.8	5.67 ±0.10	0.06 ±0.01	2.09 ±0.55	0.30 ±0.09	5.37 ±0.26	94.92 ± 0.01	7.57
16-0.8	5.17 ±0.03	0.06 ±0.04	1.88 ±0.36	0.13 ±0.04	2.73 ±0.57	69.96 ±0.49	6.40

**Tabla 28. Parámetros del modelo de Gompertz y metabolitos secundarios durante el escalamiento de la fermentación oscura**

Experimento (CAR:RIS)	$H_{max}$ (mL)	$R_{max}$ (mL/h)	$\lambda$ (h)	$R^2$	pH final	Etanol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido propiónico (g/L)	Ácido butírico (g/L)	Consumo de azúcares reductores (%)	$Y_{H_2}$ (mmol H <sub>2</sub> /g azúcar reductor)
13-1.2 escalamiento	1706.44	27.88	21.53	0.99	5.93	0.07 ±0.003	1.11 ±0.007	0.36 ±0.011	6.13 ±0.265	96.08	6.02



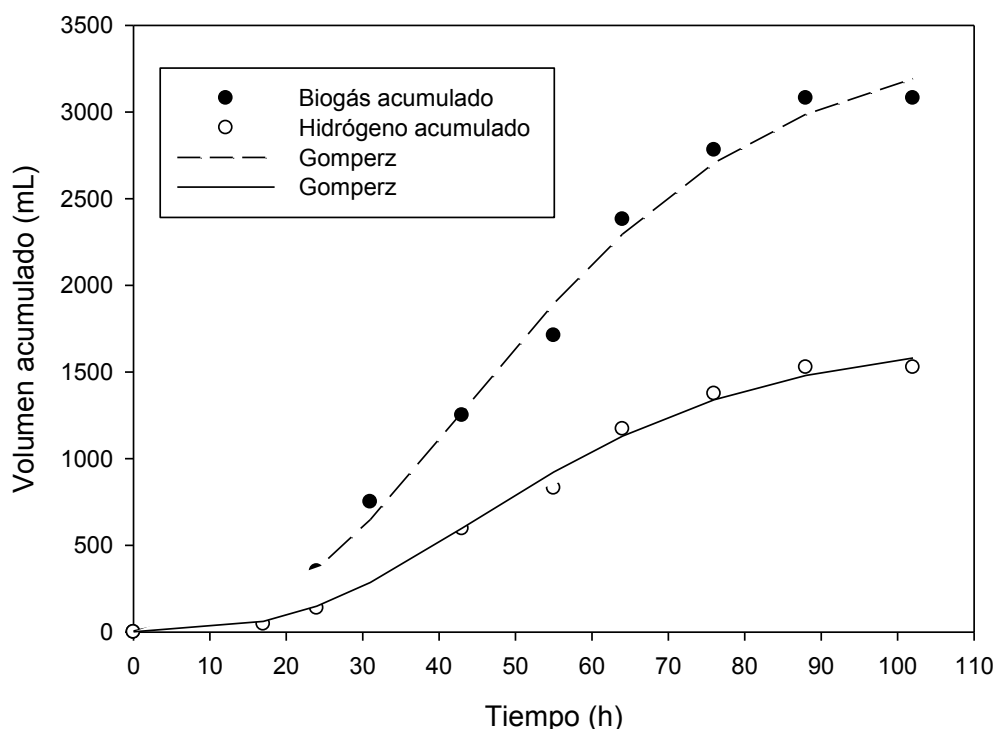
Debido a la acumulación de AOV en el medio de fermentación el pH disminuyó desde el pH inicial de 7 hasta pH inferiores a 6. Los principales metabolitos en los efluentes de FO fueron el ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y etanol, estos metabolitos son típicos de fermentaciones a partir de hidrolizados ácidos ya que incluyen glucosa y xilosa como fuente de carbono (K. Zhang et al., 2015). Las mayores concentraciones encontradas fueron del ácido butírico por lo que la producción de hidrogeno fue dominada la fermentación hacia ácido acético y ácido butírico (Gonzales et al., 2016; Rolly et al., 2016). Las concentraciones de ácido propiónico no fueron tan grandes comparadas con las del ácido acético y ácido butírico, esto se debe a la baja presencia de microorganismos productores de ácido propiónico los cuales pueden causar un efecto negativo en la producción de hidrógeno ya que usan el  $H_2$  como donador de electrones (Bundhoo et al., 2016). De manera similar, las concentraciones bajas de etanol se atribuyen a que los sistemas no fueron afectados por la presión parcial de  $H_2$  ya que se puede modificar la ruta de producción de AOV a solventes como el etanol, acetona o butanol (Levin et al., 2004).

El desempeño de la FO en términos del consumo de azúcares reductores fue evaluado. El consumo de azúcares reductores a CAR de 10 y 13 g/L fue superior al 94%, mientras que a CAR de 16 g/L, el consumos de azúcares reductores fue inferior al 81%; esto confirma la posible inhibición por sustrato o por inhibidores, debido a que a concentraciones altas de sustrato generan concentraciones altas de metabolitos secundarios causantes de inhibición, pero en nuestro caso la generación de metabolitos secundarios fue tan considerable comparada con las otras CAR (Elbeshbishy et al., 2017).

Si bien, el experimento con la CAR de 13 g/L y RIS de 1.2 tuvo la mayor producción de hidrógeno, el mayor rendimiento (10.84 mml  $H_2$ /g azúcar reductor) se presentó cuando la concentración de azúcares reductores fue de 10 g/L y la RIS de 0.8. Sin embargo, el experimento con la mayor producción de hidrógeno también presentó la máxima concentración de AOV que pueden ser utilizados por bacterias fotofermentativas para la producción de  $H_2$  (Zagrodnik et al., 2015)

Se realizó el escalamiento de la FO en un reactor con agitación con un volumen de operación de 0.8 L siguiendo la configuración del mejor tratamiento del diseño de experimento (RIS=1.2, CAR= 13 g/L). El hidrógeno acumulado durante la fermentación se puede ver en la Figura 17. El máximo % de hidrógeno en el biogás durante el experimento de escalamiento de fermentación oscura fue de 50.89. Los datos se

ajustaron al modelo de Gompertz modificado, los parámetros de la ecuación se encuentran descritos en la Tabla 28, junto al perfil de AOV, % de consumo de azúcares reductores y rendimiento de la fermentación.



**Figura 17. Volumen acumulado de biogás e hidrógeno en el escalamiento de la FO**

Debido a las variaciones en los bioprocesos se presentaron alguna variación con en el escalamiento de la FO con el diseño de experimentos. Esta variación se hace notable en el rendimiento con respecto a los azúcares reductores iniciales. Probablemente los microorganismos utilizaron una mayor fracción de los azúcares reductores para crecimiento y mantenimiento celular, comparado con el experimento con mismas condiciones en el diseño de experimento. El consumo de azúcares reductores fue similar en los dos experimentos. Se presentó una mayor concentración de ácido butírico y una menor concentración de ácido acético, indicando que la ruta de fermentación se redirigió en mayor proporción por la ruta del ácido butírico(X. Chen et al., 2006; J. Wang et al., 2009).

#### 6.4. Actividad 4. Producción de metano por digestión anaerobia con hidrolizados ácidos sólidos.

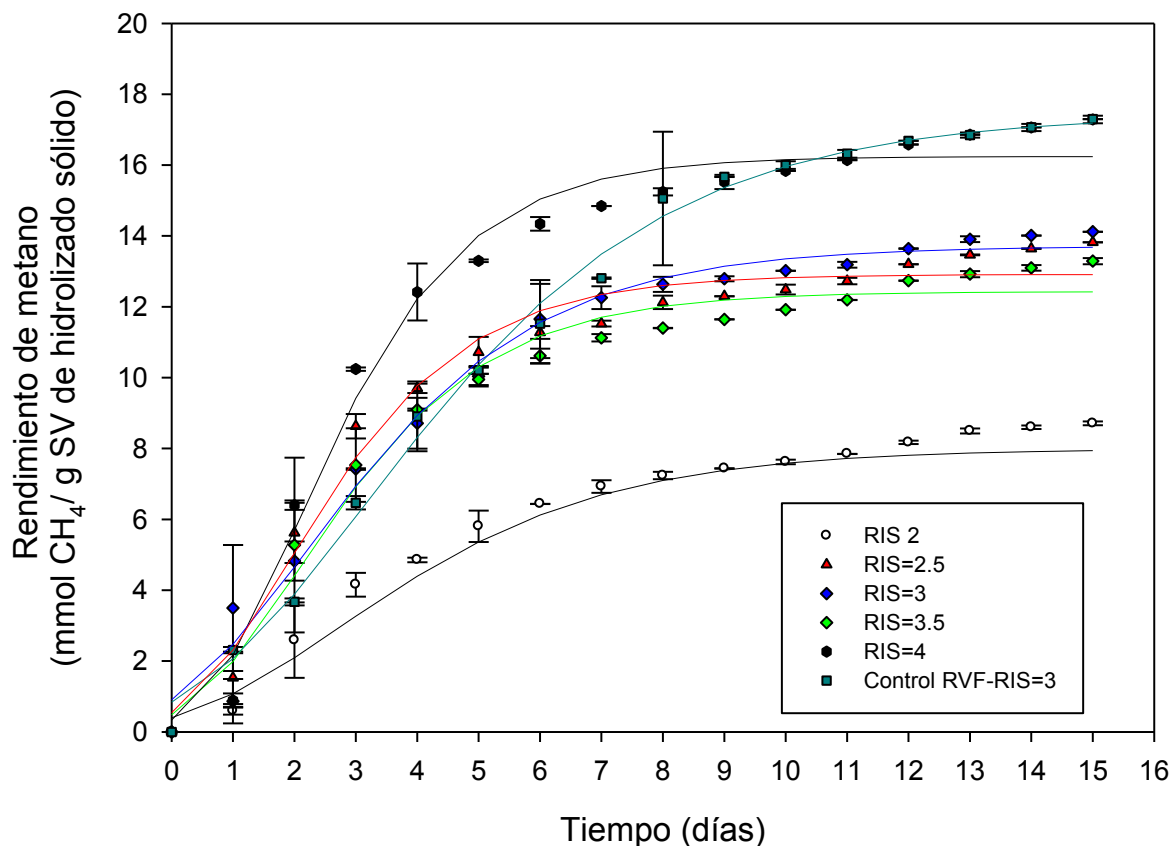
Hidrolizados sólidos del escalamiento con la combinación 75:25 RM fueron lavados dos veces para recuperar y cuantificar los azúcares reductores presentes. Después de los lavados fueron caracterizados de acuerdo como se menciona en la Tabla 12. Su caracterización fisicoquímica junto con la del inóculo metanogénico se presenta en la Tabla 29. El pH de los hidrolizados ácidos aumentó 2 unidades lo cual indica que hubo disociación de compuestos ácidos en el agua de lavado, de acuerdo con esto para no realizar algún tratamiento a los hidrolizados, se evaluaron RIS que no presentaran mayor cantidad de sustrato para evitar la inhibición por acidificación debido al carácter ácido del sustrato (Moset et al., 2015).

**Tabla 29. Caracterización del inóculo e hidrolizados sólidos**

Parámetro	Hidrolizados sólidos combinación 75:25 RVF:RM	Inóculo
pH	3.66	7.81
Humedad (%bh)	84.00 ± 0.22	93.64 ± 0.22
Sólidos totales (%bh)	16 ± 0.22	6.36 ± 0.22
Sólidos volátiles (%bs)	93.43 ± 0.13	51.46 ± 0.21
Cenizas (%bs)	6.57 ± 0.13	48.54 ± 0.21
Alcalinidad (g CaCO <sub>3</sub> /L)	200	12300
Ácidos orgánicos volátiles (g AOV/L)	220	8040
Celulosa (%bs)	24.86 ± 2.25	ND
Hemicelulosa (%bs)	17.81 ± 0.08	ND
Lignina (%bs)	16.29 ± 1.77	ND
Proteínas (%bs)	12.14	18.81
C (%bs)	56.19	25.49
H (%bs)	10.74	3.02
O (%bs)	31.15	2.84
N (%bs)	1.92	68.65
Fórmula molecular empírica	$C_{34.15}H_{78.29}O_{14.20}N$	$C_{11.97}H_{17.02}ON_{27.64}$

El tiempo de la digestión anaerobia fue de 15 días, diariamente se realizó la medición por cromatografía para determinar el contenido de metano. El rendimiento de metano acumulado con respecto al tiempo de fermentación para las distintas RIS mencionadas en la Tabla 15 se muestran en la Figura 18 junto con el ajuste en al modelo de Gompertz. El mayor rendimiento de metano de las RIS evaluadas con hidrolizados ácidos como sustrato se dio para la RIS igual a 4, seguido de la RIS 3, 2.5,

3.5 y 2. Sin embargo el control que usó RVF frescos como sustrato presentó un rendimiento máximo similar a la mejor RIS debido a que posee compuestos menos recalcitrantes y con mayor facilidad para la fermentación inmediata comparado con los hidrolizados sólidos (Yebo Li et al., 2011).



**Figura 18. Producción de metano acumulado a partir de hidrolizados sólidos.**

Los parámetros del ajuste al modelo de Gompertz, la producción acumulada de hidrógeno y el desempeño de la digestión anaerobia en términos de pH y consumo de sólidos se pueden ver en la Tabla 30. En todos los experimentos el pH no varió de forma significativa, durante los 15 días de fermentación debido a que el inóculo proporcionó la alcalinidad necesaria para mantener el sistema estable (Parra et al., 2014).

A medida que decrece la RIS se incrementa el metano acumulado a que existe mayor cantidad de sustrato disponible para la producción de metano, sin embargo se debe tener atención al realizar fermentaciones a RIS bajas porque puede haber

inhibición del metabolismo de los microorganismos productores de metano, razón por la cual el metano acumulado de la RIS 2 fue menor al de la RIS de 2.5 (Raposo et al., 2009; Slimane et al., 2014). Caso contrario pasa con el rendimiento, el cual tiene una relación directamente proporcional a la RIS, cuando la RIS aumenta el rendimiento aumenta ya que a mayor RIS menor cantidad de SV son agregados, pero también tener un mayor rendimiento depende de la fácil o difícil biodegradabilidad del sustrato, razón por la cual el mayor rendimiento fue encontrado para el experimento con RFV frescos (Zeng et al., 2010).

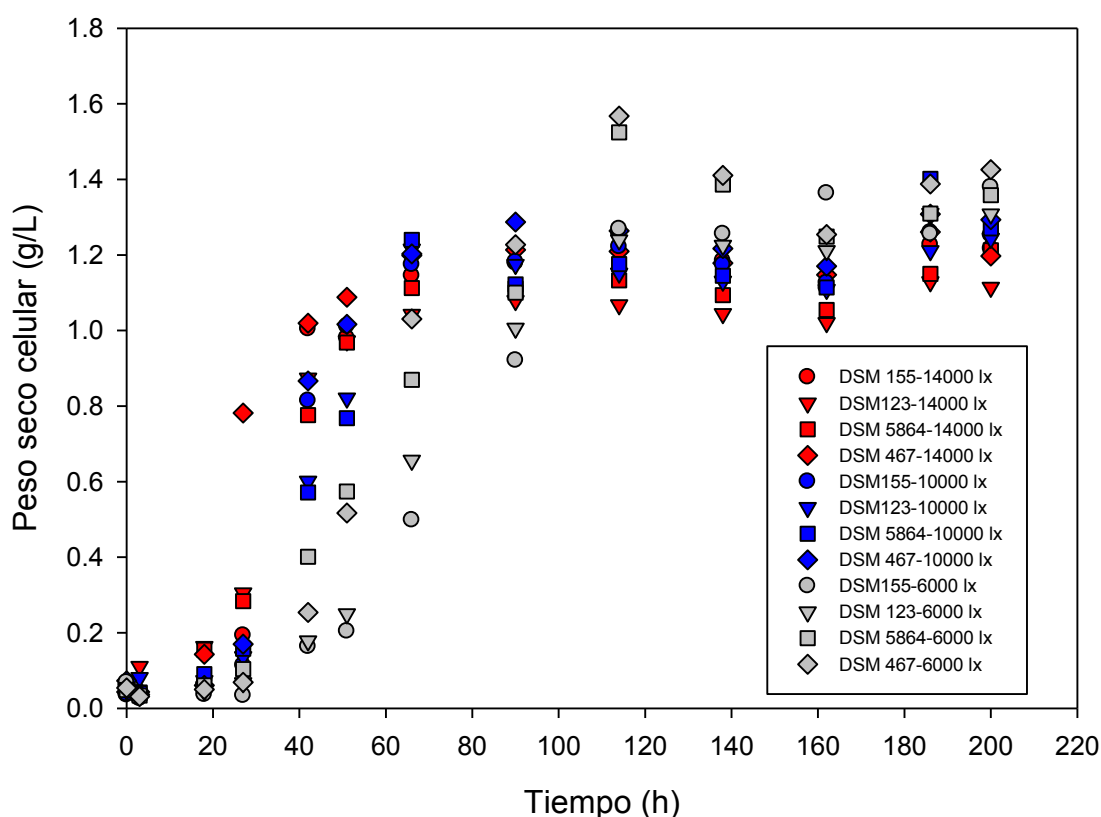
**Tabla 30. Desempeño de la digestión anaerobia y parámetros del modelo de Gompertz modificado.**

RIS	pH inicial	pH Final	Metano acumulado (mmol CH <sub>4</sub> )	B <sub>0</sub> (mmol CH <sub>4</sub> / g SV)	R <sub>m</sub> (mmol CH <sub>4</sub> / g SV d)	λ (d)	R <sup>2</sup>
2	7.53	7.68	10.88 ±0.06	8.00	1.19	0.25	0.98
2.5	7.63	7.63	13.82 ±0.00	12.91	2.89	0.25	0.98
3	7.68	7.62	11.76 ±0.00	13.72	2.32	0.00	0.99
3.5	7.72	7.69	9.49 ±0.06	12.42	2.60	0.31	0.98
4	7.71	7.66	10.80 ±0.07	16.24	3.90	0.54	0.98
RVF, RIS=3	7.8	7.72	14.41 ±0.00	17.45	2.26	0.32	0.99

## 6.5. Actividad 5. Producción de hidrógeno por fotofermentación a ácidos orgánicos volátiles provenientes de la fermentación oscura

### 6.5.1. Efecto de la intensidad lumínica en el crecimiento microbiano

La reactivación de las cepas fotofermentativas se realizó evaluando el crecimiento celular en términos de peso celular durante 200 h para las 4 cepas fotofermentativas a tres diferentes intensidades lumínicas (14000, 10000 y 6000 lx) como se muestra en la Figura 19.

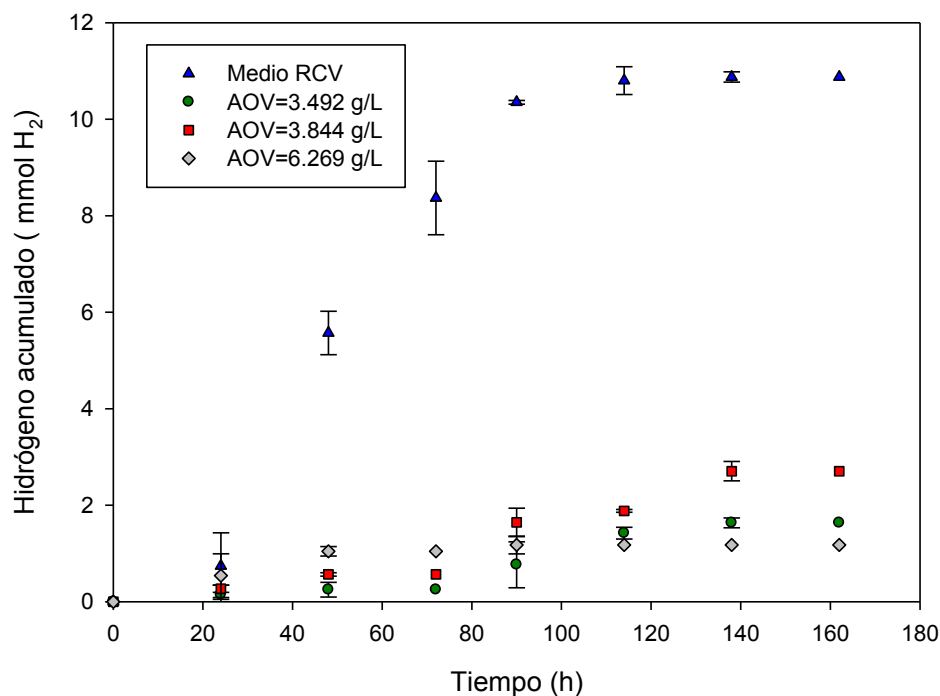


**Figura 19. Efecto de la intensidad lumínica en el crecimiento de bacterias fotofermentativas.**

El tiempo de adaptación de las bacterias a la fuente de carbono fue para su crecimiento fue menor para las bacterias evaluadas a una intensidad lumínica de 14000 lx, seguida de las evaluadas a 10000 lx y 6000 lx consecutivamente. Este efecto se debe principalmente a esa intensidad lumínica la actividad microbiana se activó rápidamente comparado con las intensidades lumínicas de 10000 y 6000 lx debido a la

rápida absorción y utilización de la luz (Kokuet al., 2002; Shi et al., 2005). Aunque la mayor concentración (1.43 g/L) se obtuvo a la intensidad lumínica de 6000 con la cepa DSM 467 su adaptación fue más tardada comparada con su experimento similar a 14000 lx el cual presentó la mejor adaptación ya que a un tiempo de 27 h su PSC fue superior a los 0.7 g/L y comparado con el PSC de las demás cepas que fue inferior a los 0.4 g/L. La cepa DSM 467 y la intensidad lumínica de 14000 lx se seleccionó para el pre-crecimiento antes de su inoculación en medio de producción de hidrógeno.

La producción de hidrógeno acumulado con el experimento presuntivo (P1FF/RCVP/AOV-FO) se puede observar en la Figura 20. La mayor producción acumulada de hidrógeno se presentó para el medio RCV, el cual es un medio ideal de producción de hidrógeno debido a la fuente de carbono es de fácil asimilación por los microorganismos. La producción de hidrógeno con este medio ha sido estudiado por varios investigadores (D. He et al., 2006; Z. Zhu et al., 2010).

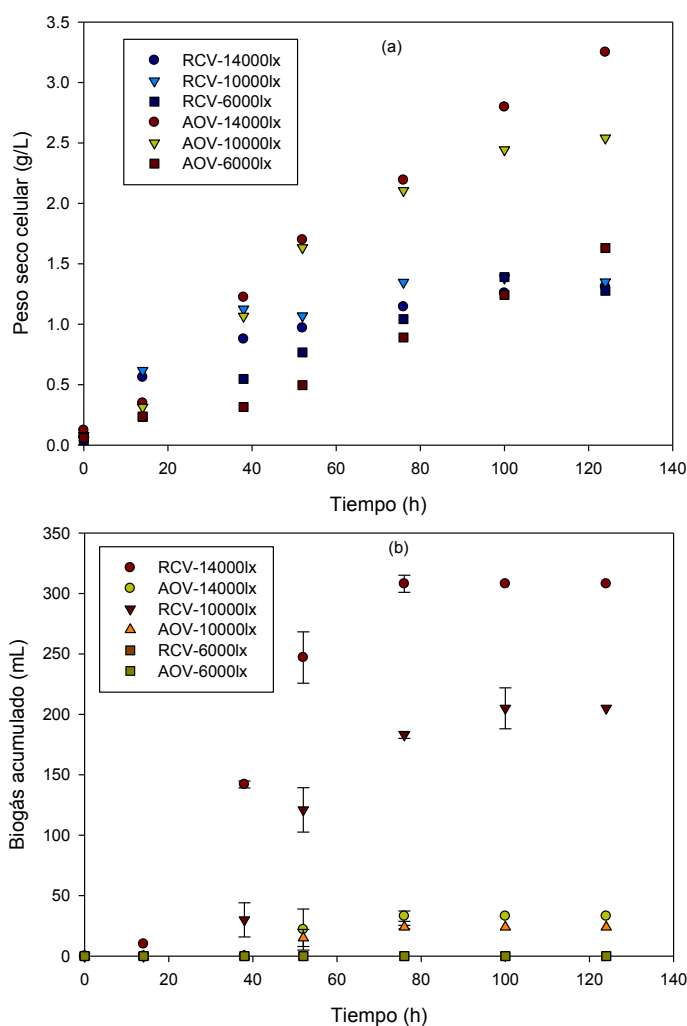


**Figura 20. Ensayo presuntivo de producción de hidrógeno por fotofermentación (P1FF/RCVP/AOV-FO)**

Bajas producciones acumuladas de hidrógeno se presentaron al utilizar AOV como fuente de carbono. Esta baja producción se debe principalmente a la alta concentración de AOV inicial y al color inicial oscuro del medio, el cual no permitió la transmisión de la luz al interior del medio de fermentación (Eroğlu et al., 2008; Su et al.,

2009). Diferentes pretratamientos se han presentado en la literatura para el tratamiento de efluentes antes de ser utilizados para la producción de hidrógeno, entre los principales se encuentran procesos avanzados de oxidación, adsorción con zeolitas o silicatos y dilución de los efluentes (Pizzolato et al., 2002). Sin embargo, pueden incrementarse los costos de operación.

Los AOV usados en el experimento (P2FF/RCVP/AOV-FO) fueron diluidos desde 10140 g/L hasta 4 g/L para evaluar la producción de hidrógeno con la bacteria DSM-467 a diferentes intensidades lumínicas. Los perfiles de crecimiento y producción de biogás ( $H_2$  no cuantificado) se representan en la Figura 21.



**Figura 21. (a) Crecimiento celular y (b) producción de biogás acumulado correspondiente al ensayo presuntivo (P2FF/RCVP/AOV-FO)**

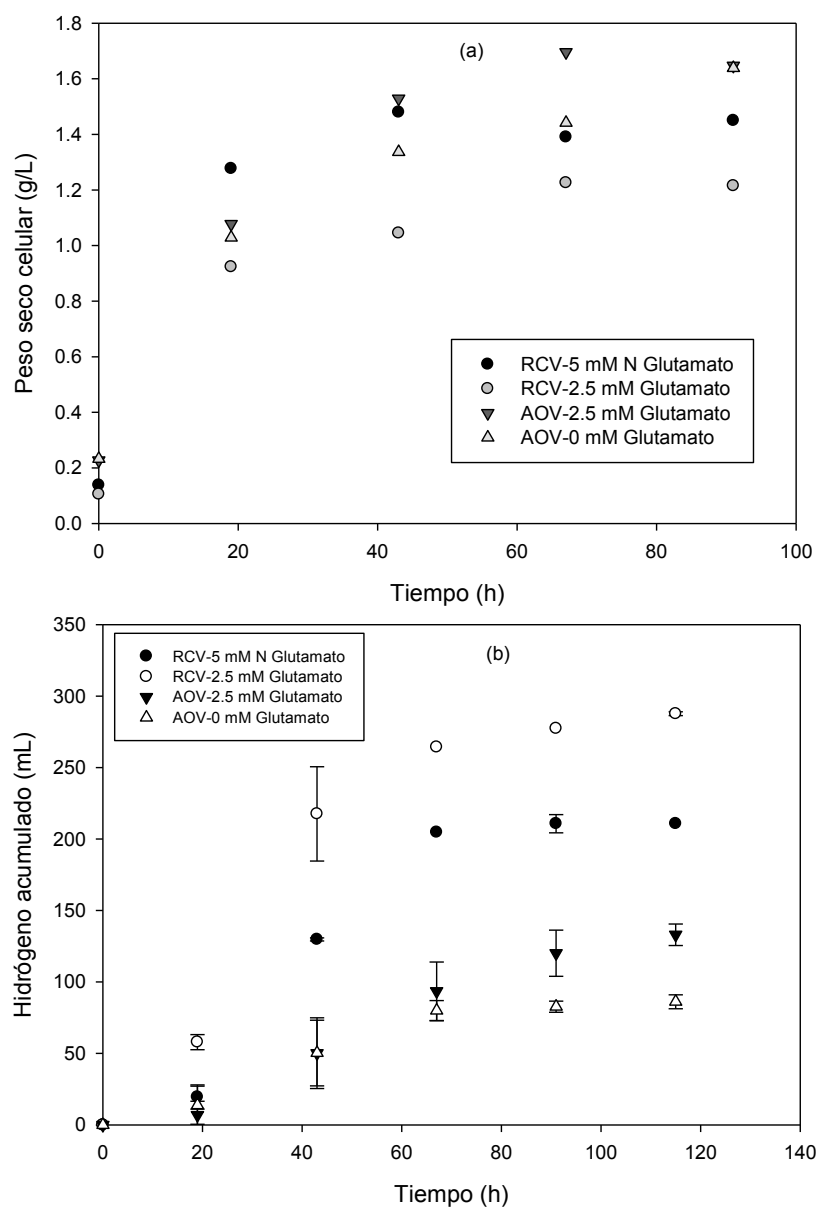
De acuerdo a lo descrito anteriormente, el crecimiento celular se vio afectado por la intensidad lumínica tanto en el medio RCVP como en el medio de AOV, debido



que el crecimiento celular fue más tardado para estos dos medios a 6000 lx de intensidad lumínica. Sin embargo, los mayores valores de PSC se presentaron para los medios con AOV a 14000 y 10000 lx en orden decreciente. Este mayor crecimiento se pudo deber a un posible contenido de nitrógeno remanente de la fermentación oscura en los hidrolizados. Por lo tanto, una mayor concentración de nitrógeno inicial, se puede ver reflejado en una alta concentración de bacterias y una baja producción de hidrógeno (Oliveira et al., 2014) o también en inhibición por alto contenido de nitrógeno (Keskin et al., 2011). Esta hipótesis se corrobora con el hidrógeno acumulado (Figura 21 b) para los AOV como fuente de carbono.

De acuerdo con lo anterior, en el experimento (P3FF/RCVP/AOV-FO) se procedió a evaluar el crecimiento y la producción de hidrógeno de la bacteria DSM-467 en medio RCVP y medio con AOV diluidos, disminuyendo la concentración de la fuente de nitrógeno. Las bacterias fotofermentativas utilizan el nitrógeno para la formación de proteínas las cuales se ubican en la membrana celular. Debido a esto, mientras mas fuente de nitrógeno se tenga en el medio mayor formación de proteínas y células se podrán encontrar (Koku, 2002). Este comportamiento se puede ver en la Figura 22.

El PSC fue mayor cuando la concentración de fuente de N fue de 5 mM y relativamente inferior a la concentración de 2.5 mM en el medio RCVP. A esta concentración de 2.5 mM se redireccionó la fermentación a la transformación de la fuente de carbono en  $H_2$  como se observa en la Figura 22 b, en la que el hidrógeno acumulado fue mayor (287.64 mL  $H_2$ ) comparado a la condición de 5 mM de fuente de nitrógeno inicial (210.75 mL  $H_2$ ). La bacteria DSM-467 creció en el medio AOV con adición y sin adición de fuente nitrógeno. En un tiempo de 115 h de fermentación, la concentración celular en los dos experimentos fue similar, posiblemente debido a una inhibición por la fuente de nitrógeno de 2.5 mM; Sin embargo, el hidrógeno acumulado a una concentración inicial de 2.5 mM de glutamato fue superior comparado con el medio sin glutamato.



**Figura 22. Evaluación de la fuente de la concentración de la fuente de nitrógeno en la producción de hidrógeno, ensayo presuntivo (P3FF/RCVP/AOV-FO)**

## 6.6. Actividades pendientes por realizar

De acuerdo al planteamiento y desarrollo de la investigación, quedan por realizar tres actividades. Estas actividades se mencionan en la Tabla 31 y se propone una fecha final para su realización.

**Tabla 31. Cronograma de actividades por realizar**

Actividad	Fecha	Descripción
Ensayos de producción de hidrógeno a partir de AOV provenientes de la FO	30 de abril 2018	Se realizará la evaluación de la producción de hidrógeno a partir de los AOV recuperados del reactor de escalamiento de la FO
Evaluación del impacto ambiental del modelo de biorrefinería a escala laboratorio	Abril- mayo 2018	Basados en la metodología del análisis del ciclo de vida, se realizará el análisis ambiental del modelo de biorrefinería.
Corrección y actualización del documento de tesis	Abril-junio 2018	Se complementará el documento de tesis con los nuevos resultados y se realizarán las correcciones propuestas por el comité tutorial y el asesor.

## 7. CONCLUSIONES

### Hidrolisis de co-sustratos

- A mayor concentración de RVF en las mezclas de co-sustrato, mayor liberación de azúcares reductores. La mayor concentración de azúcares fermentables ( $27.32 \pm 1.05$  g/L) y la mayor eficiencia de conversión ( $96.74 \pm 3.27$  %) se presentaron para 100:0 RVF:RM. También RVF presentó menor Icr que RM.
- La mayor concentración de iones hidrónio en la solución de HCl tuvo una mayor liberación de azúcares reductores comparado con  $H_2SO_4$ .
- Considerando el rendimiento de azúcares en base a la concentración de iones hidronio, el  $H_2SO_4$  presenta mejores resultados. Por lo tanto, la degradación de celulosa y hemicelulosa posiblemente fue influenciada por la interacción de las especies químicas del ácido y la biomasa.

### Fermentación oscura

- Una concentración alta de azúcares reductores induce a un tiempo de adaptación mayor y a la inhibición en la producción de  $H_2$  por acumulación de sustrato.
- El consumo de azúcares reductores fue superior al 94% a concentraciones de 10 y 13 g/L. La RIS de 1.2 la que tuvo mayor producción de hidrógeno con 13 g/L de azúcares reductores.
- La producción de metabolitos secundarios de fermentación se redirigió a la producción de ácido butírico, ácido acético, ácido propiónico y etanol en orden decreciente.

### Digestión anaerobia

- Se pudo acoplar el uso de hidrolizados ácidos sólidos como sustrato para la producción de metano por digestión anaerobia.
- El rendimiento de metano ( $mmol CH_4/g$  SV hidrolizado sólido) fue proporcional al incremento de la relación inóculo sustrato RIS.
- El mayor metano acumulado ( $14.41 \pm 0.00$   $mmol CH_4$ ) y el mayor rendimiento ( $17.45$   $mmol CH_4/g$  SV) se obtuvo para el experimento control con RVF frescos.
- El inóculo utilizado proporcionó estabilidad en el desarrollo de la fermentación evitando la inhibición de los microorganismos productores de metano.

### Fotofermentación

- En la reactivación de las cepas fotofermentativas tuvo un efecto importante la intensidad lumínica evaluada. Intensidades menores presentaron mayores concentraciones finales pero largos tiempos de fase de adaptación.
- La mejor cepa fue la DSM-467 *Rhodospirillum rubrum* a una intensidad lumínica de 14000 lx.
- El color del medio con AOV presentó un efecto inhibitorio en la producción de hidrógeno.
- La dilución de los AOV en el medio inicial de fermentación mejoró la producción de hidrógeno.
- Una importante diferencia se encontró en la producción de hidrógeno variando la concentración de la fuente de carbono en el medio RCVP mientras que en el medio AOV la diferencia no fue tan considerable.

## REFERENCIAS

- Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials. *Waste Management*, 36, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>
- Almeida, J. R. M., Fávaro, L. C. L., & Quirino, B. F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste, 1–16.
- Alvarez, R., & Lidén, G. (2008). Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renewable Energy*, 33(4), 726–734. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2007.05.001>
- Anderson, G. K., & Yang, G. (1992). Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digesters using a simple titration. *Water Environment Research*, 64(1), 53–59. <https://doi.org/10.2175/WER.64.1.8>
- AOAC. (1992). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136–138.
- APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>
- Argun, H., & Kargi, F. (2010). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of ground wheat solution: Effects of light source and light intensity. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(4), 1595–1603. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.040>
- Argun, H., & Kargi, F. (2011). Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7443–7459. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.116>
- Argun, H., & Onaran, G. (2016). Glucose and 5-hydroxymethylfurfural production from cellulosic waste by sequential alkaline and acid hydrolysis. *Renewable Energy*, 96, 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.04.082>
- Arreola-Vargas, J., Ojeda-Castillo, V., Snell-Castro, R., Corona-González, R. I., Alatríste-Mondragón, F., & Méndez-Acosta, H. O. (2015). Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse: Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource Technology*, 181, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>
- Asif, M., & Muneer, T. (2007). Energy supply, its demand and security issues for developed and emerging economies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 11(7), 1388–1413. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2005.12.004>
- Aslanzadeh, S., Rajendran, K., & Taherzadeh, M. J. (2014). A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: Effects of organic loading rate and hydraulic retention time. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.008>
- Avci, A., Saha, B. C., Dien, B. S., Kennedy, G. J., & Cotta, M. A. (2013). Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*, 130, 603–612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.104>
- Ávila-lara, A. I., Camberos-flores, J. N., & Mendoza-pérez, J. A. (2015). Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology, 3(September), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00146>
- Azman, N. F., Abdesahian, P., Al-Shorgani, N. K. N., Hamid, A. A., & Kalil, M. S. (2016). Production of hydrogen energy from dilute acid-hydrolyzed palm oil mill effluent in dark fermentation using an empirical model. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.05.085>

- Beltrán Cabanzo, J. C., & Rodríguez Valderrama, S. (2016). DESEMPEÑO Y ESTABILIDAD DE UN REACTOR CSTR A ESCALA LABORATORIO PARA LA DIGESTIÓN ANAEROBIA DE SOBRESALIENTES ALIMENTICIOS DE RESTAURANTE: ARRANQUE, PUESTA EN MARCHA Y RECUPERACIÓN.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & Palazzo de Mello, J. C. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. *Molecules*, 18, 6852–6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Blanco Londoño, S. A. (2013). *Producción de biohidrógeno a través de la fermentación oscura de residuos – Revisión crítica*. Universidad Nacional de Colombia.
- Blanco Londoño, S. A., & Rodríguez Chaparro, T. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos mediante fermentación oscura : una revisión crítica ( 1993-2011 ) Biohydrogen production from wastes via dark fermentation : A critical review. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 20(3), 398–411. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-33052012000300014>
- Borrion, A. L., McManus, M. C., & Hammond, G. P. (2012). Environmental life cycle assessment of bioethanol production from wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 47, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.017>
- Bouallagui, H., Lahdheb, H., Ben Romdan, E., Rachdi, B., & Hamdi, M. (2009). Improvement of fruit and vegetable waste anaerobic digestion performance and stability with co-substrates addition. *Journal of Environmental Management*, 90(5), 1844–1849. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.12.002>
- Brown, M. E., & Chang, M. C. Y. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.015>
- Bujang, N., Rodhi, M. N. M., Musa, M., Subari, F., Idris, N., Makhtar, N. S. M., & Hamid, K. H. K. (2013). Effect of dilute sulfuric acid hydrolysis of coconut dregs on chemical and thermal properties. *Procedia Engineering*, 68, 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.12.194>
- Bundhoo, M. A. Z., & Mohee, R. (2016). Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(16), 6713–6733. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>
- Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.04.006>
- Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2015). Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresource Technology*, 178, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>
- Campuzano, R., & González-Martínez, S. (2016). Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Management*, 54, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>
- Cao, G. L., Ren, N. Q., Wang, A. J., Guo, W. Q., Xu, J. F., & Liu, B. F. (2010). Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), 13475–13480. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.127>
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D., Guo, W., & Liu, B. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7182–7188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>

- Carrillo Verastegui Kenia, Ignacio, C. U., & Escamilla-alvarado, C. (2017). Hidrólisis ácida de residuos agrícolas-GIBIOS.
- Castelló, E., Perna, V., Etchebehere, C., & Borzacconi, L. (2012). Producción de biohidrógeno a partir de residuos orgánicos. *XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Química*, 1–5. Retrieved from <http://aiquruguay.org/congreso/download/P45.pdf>
- Castillo, A., Castillo, A. A., Delgado, R. S., Hernández, E. G., Domínguez, M. M., Baeza, J. M. G., ... Martínez, A. M. M. (2012). Aprovechamiento Integral De Los Materiales Lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 140–150.
- Chang, A. C. C., Tu, Y. H., Huang, M. H., Lay, C. H., & Lin, C. Y. (2011a). Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14280–14288. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.142>
- Chang, A. C. C., Tu, Y. H., Huang, M. H., Lay, C. H., & Lin, C. Y. (2011b). Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 14280–14288. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.142>
- Chang, A. C. C., Tu, Y., Huang, M., Lay, C., & Lin, C. (2011c). Hydrogen production by the anaerobic fermentation from acid hydrolyzed rice straw hydrolysate, 6, 0–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.04.142>
- Chen, P., Xie, Q., Addy, M., Zhou, W., Liu, Y., Wang, Y., ... Ruan, R. (2016). Utilization of municipal solid and liquid wastes for bioenergy and bioproducts production. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.094>
- Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X., & Zhang, D. (2006). Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2005.03.013>
- Chu, C. F., Li, Y. Y., Xu, K. Q., Ebie, Y., Inamori, Y., & Kong, H. N. (2008). A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(18), 4739–4746. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.06.060>
- Cisneros-Pérez, C., Etchebehere, C., Celis, L. B., Carrillo-Reyes, J., Alatríste-Mondragón, F., & Razo-Flores, E. (2017). Effect of inoculum pretreatment on the microbial community structure and its performance during dark fermentation using anaerobic fluidized-bed reactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(15), 9589–9599. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.03.157>
- Cortes Ortiz, W. G. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Journall of Technology*, 13(1), 39–44.
- Datar, R., Huang, J., Maness, P. C., Mohagheghi, A., Czernik, S., & Chornet, E. (2007). Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(8), 932–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.09.027>
- del Campo, I., Alegría, I., Zazpe, M., Echeverría, M., & Echeverría, I. (2006). Diluted acid hydrolysis pretreatment of agri-food wastes for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.014>
- DGN-AA-33-1976. (1976). NORMA Oficial Mexicana. “Determinación del poder calorífico en desechos sólidos.”
- Di Maria, F., Sordi, A., & Micale, C. (2012). Optimization of Solid State Anaerobic Digestion by inoculum recirculation: The case of an existing Mechanical Biological Treatment plant. *Applied Energy*, 97, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.093>



- Elbeshbishy, E., Dhar, B. R., Nakhla, G., & Lee, H. S. (2017). A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(May), 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.075>
- EPA-821-R-01-004. (2001). Method 1690 Ammonia-N in Water and Biosolids by Automated Colorimetry with Preliminary Distillation DRAFT January 2001 U . S . Environmental Protection Agency Office of Water Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division ( 4303 ). *Environmental Protection*, (January).
- Eroğlu, E., Eroğlu, I., Gündüz, U., & Yücel, M. (2008). Effect of clay pretreatment on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(15), 6799–6808. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.076>
- Escamilla-Alvarado, C. (2014). *Integración de un proceso modelo de biorrefinería para la obtención de hidrógeno , metano , enzimas y sacarificados a partir de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos*. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional.
- Escamilla-alvarado, C., Poggi-varaldo, H. M., & Ponce-noyola, M. T. (2016). Bioenergy and bioproducts from municipal organic waste as alternative to landfilling : a comparative life cycle assessment with prospective application to Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(33), 25602–25617. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6939-z>
- Escamilla-Alvarado, C., Poggi-Varaldo, H. M., & Ponce-Noyola, M. T. (2016). Bioenergy and bioproducts from municipal organic waste as alternative to landfilling: a comparative life cycle assessment with prospective application to Mexico. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6939-z>
- Escamilla-Alvarado, C., Ponce-Noyola, T., Ríos-Leal, E., & Poggi-Varaldo, H. M. (2013). A multivariable evaluation of biohydrogen production by solid substrate fermentation of organic municipal wastes in semi-continuous and batch operation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(28), 12527–12538. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.124>
- Escamilla-alvarado, C., Ponce-noyola, T., Ríos-Leal, E., Robles-Gonzalez/Ileri, & Rinderknecht-Seijas/Noemí. (2015). ScienceDirect Saccharification of fermented residues as integral part in a conceptual hydrogen-producing biorefinery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, 17200–17211. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.06.164>
- Fangkum, A., & Reungsang, A. (2011). Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effects of initial pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(14), 8687–8696. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.119>
- Fantozzi, F., & Buratti, C. (2011). Anaerobic digestion of mechanically treated OFMSW: Experimental data on biogas/methane production and residues characterization. *Bioresource Technology*, 102(19), 8885–8892. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.077>
- FAO. (2012). *Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo-Alcance y prevención*. Roma.
- Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., & Romero, L. I. (2013). Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chemical Engineering Journal*, 232, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.066>
- FIRA. (2016). Panorama Agroalimentario, maíz 2016. *Fidecomisos Instituidos En Relación Con La Agricultura*, 0–40.
- Fu, S., Wang, F., Yuan, X., Yang, Z., & Luo, S. (2015). The thermophilic ( 55 ° C ) microaerobic pretreatment of corn straw for anaerobic digestion. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 175, 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.072>
- Gani, A., & Naruse, I. (2007). Effect of cellulose and lignin content on pyrolysis and combustion characteristics for several types of biomass. *Renewable Energy*, 32(4), 649–661.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.02.017>

- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudie, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Ghimire, A., Valentino, S., Frunzo, L., Trably, E., Pirozzi, F., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). Biohydrogen production from food waste by and residue post-treatment to anaerobic digestion: A synergy for energy recovery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(46), 16045–16055. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.09.117>
- Ginkel, S. Van, Sung, S., & Lay, J.-J. (2001). Biohydrogen Production as a Function of pH and Substrate Concentration. *Environmental Science & Technology*, 35(24), 4726–4730. <https://doi.org/10.1021/es001979r>
- Giroto, F., Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: A review. *Waste Management*, 45, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.008>
- Giuliano, A., Poletto, M., & Barletta, D. (2016). Process optimization of a multi-product biorefinery: The effect of biomass seasonality. *Chemical Engineering Research and Design*, 107, 236–252. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2015.12.011>
- Gobierno de México. (2015). Documento de Posición de México en 21<sup>a</sup> Conferencia de las Partes de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, 1–13.
- Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., & Kim, S.-H. (2016). Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 21678–21684. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.198>
- Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., Parthiban, A., & Kim, S. H. (2016). Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 113, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.016>
- González-Sánchez, M. E., Pérez-Fabiel, S., Wong-Villalreal, A., Bello-Mendoza, R., & Yáñez-Ocampo, G. (2015). Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.05.003>
- González, L. E., Díaz, G. C., Alexandre, D., Aranda, G., Cruz, Y. R., & Fortes, M. M. (2015). Biodiesel Production Based in Microalgae: A Biorefinery Approach, (July), 358–369.
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., Anzaldo Hernández, J., & Sanjuán Dueñas, R. (2015). Obtención de azúcares fermentables desde residuos de cartón para cultivar levaduras de interés biotecnológico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 88–105. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11322015000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Guinée, J. B., Heijungs, R., Huppes, G., Kleijn, R., de Koning, A., van Oers, L., ... Gorée, M. (2001). Life Cycle Assessment: An Operational Guide to the ISO Standards. *The Netherlands: Ministry of ...*, (May), 692. <https://doi.org/10.1007/BF02978784>
- Gunaseelan, V. N. (2004). Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks, 26, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.006>
- Gunaseelan, V. N. (2007). Regression models of ultimate methane yields of fruits and vegetable solid wastes, sorghum and napiergrass on chemical composition. *Bioresource Technology*, 98(6), 1270–1277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.014>
- Haikonen, T., Tuomaala, M., Holmberg, H., & Ahtila, P. (2013). Evaluating municipal energy efficiency in biorefinery integration. *Energy*, 63, 260–267.

<https://doi.org/10.1016/j.energy.2013.09.065>

- He, D., Bultel, Y., Magnin, J., & Willison, J. C. (2006). Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter Capsulatus*, 38, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.012>
- He, X., Zhang, K., Wang, W., Li, H., & Yin, Q. (2018). Thermal Stability and Bonding Mechanisms of Corn Stalk Rind. *BioResources*, 13(2), 2748–2758.
- Hellin, J., Erenstein, O., Beuchelt, T., Camacho, C., & Flores, D. (2013). Maize stover use and sustainable crop production in mixed crop-livestock systems in Mexico. *Field Crops Research*, 153, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2013.05.014>
- Hernández, M. A., Rodríguez Susa, M., & Andres, Y. (2014). Use of coffee mucilage as a new substrate for hydrogen production in anaerobic co-digestion with swine manure. *Bioresource Technology*, 168, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.101>
- Herrera Rosales, D. L. (2016). *Hidrólisis de bagazo de agave pretratado con líquidos iónicos y su aplicación a cultivos microbianos*. Instituto Tecnológico de Durango.
- Hierholtzer, A., Chatellard, L., Kierans, M., Akunna, J. C., & Collier, P. J. (2013). The impact and mode of action of phenolic compounds extracted from brown seaweed on mixed anaerobic microbial cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 964–973. <https://doi.org/10.1111/jam.12114>
- Hilpmann, G., Becher, N., Pahner, F. A., Kusema, B., Mäki-Arvela, P., Lange, R., ... Salmi, T. (2014). Acid hydrolysis of xylan. *Catalysis Today*, 259, 376–380. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.04.044>
- Hongqiang, L., & Hongzhang, C. (2008). Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor, 43, 1447–1451. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.003>
- Huang, Y.-B., & Fu, Y. (2013). Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chemistry*, 15(5), 1095. <https://doi.org/10.1039/c3gc40136g>
- Hutomo, G. S., Rahim, A., & Kadir, S. (2015). The Effect of Sulfuric and Hydrochloric Acid on Cellulose Degradation from Pod Husk Cacao. *International Journal on Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(10), 89–95.
- IEA. (2010). World Energy Outlook 2010. *Outlook*.
- IEA. (2016). Mexico Energy Outlook. *International Energy Agency, Paris, France*, 129. Retrieved from <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/MexicoEnergyOutlook.pdf>
- INEGI. (2014). Encuesta Nacional Agropecuaria.
- IPCC. (2011). *Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation*. <https://doi.org/10.5860/CHOICE.49-6309>
- ISO. (2006a). Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and guidelines. *The International Standards Organisation*, 2006(7), 652–668. <https://doi.org/10.1007/s11367-011-0297-3>
- ISO. (2006b). *ISO 14040. Environmental management-life cycle assessment-principles and framework* (Vol. E). Geneva.
- Jiang, D., Ge, X., Zhang, T., Liu, H., & Zhang, Q. (2016). Photo-fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of corn stalk pith with a photosynthetic consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(38), 16778–16785. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.129>
- Johar, N., Ahmad, I., & Dufresne, A. (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 93–

99. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.12.016>
- Jung Yeol, L., & Chen, X. J. (2012). Effects of pH and Carbon Sources on Biohydrogen Production by Co-Culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 400–406.
- Jyoti, S., Pachapur, V., Kaur, S., Le, Y., & Buelna, G. (2015). Hydrogen biorefinery: Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 942–951. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.191>
- Keskin, T., Abo-Hashesh, M., & Hallenbeck, P. C. (2011). Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technology*, 102(18), 8557–8568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.004>
- Khan, M. A., Ngo, H. H., Guo, W. S., Liu, Y., Nghiem, L. D., Hai, F. I., ... Wu, Y. (2016). Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 219, 738–748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.073>
- Kim, S. H., Han, S. K., & Shin, H. S. (2008). Optimization of continuous hydrogen fermentation of food waste as a function of solids retention time independent of hydraulic retention time. *Process Biochemistry*, 43(2), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.007>
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 10–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1642-2>
- Koku, H. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, 27, 1315–1329.
- Kumar, G., Cheon, H. C., & Kim, S. H. (2014). Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H<sub>2</sub> production from glucose and galactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16885–16890. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.063>
- Kumar, S., Dheeran, P., Singh, S. P., Mishra, I. M., & Adhikari, D. K. (2015). Kinetic studies of two-stage sulphuric acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, 83, 850–858. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.05.033>
- Lalauette, E., Thammannagowda, S., Mohagheghi, A., Maness, P. C., & Logan, B. E. (2009). Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(15), 6201–6210. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.112>
- Larsson, S., Reimann, A., Nilverbrant, N. O., & Jönsson, L. (1999). Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77, 2273–2289.
- Lee, D.-Y., Xu, K.-Q., Kobayashi, T., Li, Y.-Y., & Inamori, Y. (2014). Effect of organic loading rate on continuous hydrogen production from food waste in submerged anaerobic membrane bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(30), 16863–16871. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.08.022>
- Levin, D. B., Pitt, L., & Love, M. (2004). Biohydrogen production: Prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(03\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(03)00094-6)
- Li, D., Huang, X., Wang, Q., Yuan, Y., Yan, Z., Li, Z., ... Liu, X. (2016). Kinetics of methane production and hydrolysis in anaerobic digestion of corn stover. *Energy*, 102, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.02.074>
- Li, H., Tian, Y., Zuo, W., Zhang, J., Pan, X., Li, L., & Su, X. (2016). Electricity generation from food wastes and characteristics of organic matters in microbial fuel cell. *Bioresource*

- Technology*, 205, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.042>
- Li, H., & Xu, J. (2013). Optimization of microwave-assisted calcium chloride pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 127, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.114>
- Li, H. Y., Xu, L., Liu, W. J., Fang, M. Q., & Wang, N. (2014). Assessment of the nutritive value of whole corn stover and its morphological fractions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(2), 194–200. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13446>
- Li, K., Liu, R., & Sun, C. (2016). A review of methane production from agricultural residues in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.103>
- Li, Y., Fan, H., Yu, X., Zhang, S., & Li, G. (2016). Hemicellulose in corn straw: Extracted from alkali solution and produced 5-hydroxymethyl furfural in HCOOH/HCOONa buffer solution. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 24(12), 1786–1792. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2016.05.016>
- Li, Y., Park, S. Y., & Zhu, J. (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>
- Lin, R., Cheng, J., Ding, L., Song, W., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. *Bioresource Technology*, 196, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.097>
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P., & Gorsich, S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 345–352. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0148-3>
- Lo, H. M., Kurniawan, T. A., Sillanpää, M. E. T., Pai, T. Y., Chiang, C. F., Chao, K. P., ... Wu, H. Y. (2010). Modeling biogas production from organic fraction of MSW co-digested with MSWI ashes in anaerobic bioreactors. *Bioresource Technology*, 101(16), 6329–6335. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.048>
- Lopez, V. M., De la Cruz, F. B., & Barlaz, M. A. (2016). Chemical composition and methane potential of commercial food wastes. *Waste Management*, 56, 477–490. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.07.024>
- Manals-Cutiño, E., Penedo-Medina, M., & Giralt-Ortega, G. (2011). ANÁLISIS TERMOGRAVIMETRICO Y TÉRMICO DIFERENCIAL DE DIFERENTES BIOMASAS VEGETALES. *Tecnología Química*, 31(2), 180–190. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-61852011000200005&lng=es&nrm=iso&tng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852011000200005&lng=es&nrm=iso&tng=es)
- Manish, S., & Banerjee, R. (2008). Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1), 279–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.026>
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., & Ren, G. (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45, 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Martinez, A., Rodriguez, M. E., York, S. W., Preston, J. F., & Ingram, L. O. (2000). Effects of Ca ( OH ) 2 Treatments ( “ Overliming ” ) on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysates.

- Min, S., Dien, B. S., Tumbleson, M. E., Rausch, K. D., & Singh, V. (2016). Improvement of sugar yields from corn stover using sequential hot water pretreatment and disk milling. *Bioresource Technology*, 216, 706–713. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.003>
- Molinuevo-Salces, B., Gómez, X., Morán, A., & García-González, M. C. (2013). Anaerobic co-digestion of livestock and vegetable processing wastes: Fibre degradation and digestate stability. *Waste Management*, 33(6), 1332–1338. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.021>
- Möller, M., & Schröder, U. (2013). Hydrothermal production of furfural from xylose and xylan as model compounds for hemicelluloses. *RSC Advances*, 3, 22253–22260. <https://doi.org/10.1039/c3ra43108h>
- Moncada, J., Aristizábal, V., & Cardona, C. A. (2016). Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochemical Engineering Journal*, In Press. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T., & Carvalheiro, F. (2013). Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Industrial Crops and Products*, 50, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.037>
- Monlau, F., Aemig, Q., Trably, E., Hamelin, J., Steyer, J. P., & Carrere, H. (2013). Specific inhibition of biohydrogen-producing *Clostridium* sp. after dilute-acid pretreatment of sunflower stalks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(28), 12273–12282. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.018>
- Montgomery, D. C. (2004). Diseño y análisis de experimentos. In LIMUSA WILEY (Ed.) (Segunda ed, pp. 194–201).
- Morais, A. R., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Green chemistry and the biorefinery concept. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-18>
- Moset, V., Al-zohairi, N., & Moller, H. B. (2015). The impact of inoculum source, inoculum to substrate ratio and sample preservation on methane potential from different substrates. *Biomass and Bioenergy*, 83, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.018>
- Naciones Unidas. (2015). Informe de las Naciones Unidas sobre los Recursos Hídricos en el Mundo 2015: Agua para un mundo sostenible., 1–12.
- Narron, R. H., Kim, H., Chang, H. M., Jameel, H., & Park, S. (2016). Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.018>
- Nawirska, A., & Kwaśniewska, M. (2005). Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chemistry*, 91(2), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.005>
- Neureiter, M., Danner, H., Madzingaidzo, L., Miyafuji, H., Thomasser, C., Bvochora, J., ... Braun, R. (2004). Lignocellulose Feedstocks for the Production of Lactic Acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 18(1), 55–63.
- Nissilä, M. E., Lay, C. H., & Puhakka, J. A. (2014). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates - A review. *Biomass and Bioenergy*, 67, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>
- Nissila, M. E., Lay, C., & Puhakka, J. A. (2014a). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates-A review, 7. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.035>
- Nissila, M. E., Lay, C., & Puhakka, J. A. (2014b). Dark fermentative hydrogen production from lignocellulosic hydrolyzates e A review, 7.
- NMX-AA-25-1984. (1992). Norma Mexicana NMX-AA-25-1984. Protección al ambiente-Contaminación del suelo-residuos sólidos-determinación del pH-Método potenciométrico. *Norma Mexicana*, 4–5.

- Oliveira, T. V., Bessa, L. O., Oliveira, F. S., Ferreira, J. S., Batista, F. R. X., & Cardoso, V. L. (2014). Insights into the Effect of Carbon and Nitrogen Source on Hydrogen Production by Photosynthetic Bacteria, *38*, 367–372. <https://doi.org/10.3303/CET1438062>
- Ozmihci, S., & Kargi, F. (2010). Bio-hydrogen production by photo-fermentation of dark fermentation effluent with intermittent feeding and effluent removal. *International Journal of Hydrogen Energy*, *35*(13), 6674–6680. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.090>
- Ozmihci, S., Kargi, F., & Cakir, A. (2011). Thermophilic dark fermentation of acid hydrolyzed waste ground wheat for hydrogen gas production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(3), 2111–2117. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.11.033>
- Parra, B., Torres, P., Marmolejo, L., Cárdenas, L., Vásquez, C., Torres, W., & Ordóñez, J. (2014). Influencia del pH sobre la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *17*(2), 553–562.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., & Reungsang, A. (2008). Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*, *33*, 5256–5265. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.008>
- Pizzolato, T. M., Carissimi, E., Machado, E. L., & Schneider, I. A. H. (2002). Colour removal with NaClO of dye wastewater from an agate-processing plant in Rio Grande do Sul, Brazil. *International Journal of Mineral Processing*, *65*(3–4), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(01\)00082-5](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(01)00082-5)
- Poggi-varaldo, H. M. (2016). An overview of the enzyme potential in bioenergy-producing biorefineries Carlos Escamilla-Alvarado , a \* José A Pérez-Pimienta , b Teresa Ponce-Noyola c, (April). <https://doi.org/10.1002/jctb.5088>
- Poggi-Varaldo, H. M., Munoz-Paez, K. M., Escamilla-Alvarado, C., Robledo-Narváez, P. N., Ponce-Noyola, M. T., Calva-Calva, G., ... Rinderknecht-Seijas, N. F. (2014). Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: a review. *Waste Management & Research: The Journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA*, *32*(5), 353–365. <https://doi.org/10.1177/0734242X14529178>
- Poggi-varaldo, H. M., Muñoz-páez, K. M., Escamilla-alvarado, C., Robledo-narváez, P. N., Teresa, M., Calva-calva, G., ... Ponce-noyola, M. T. (2014). Waste Management & Research review organic wastes : A review. <https://doi.org/10.1177/0734242X14529178>
- Poggi-Varaldo, H. M., Valdés, L., Esparza-García, F., & Fernández-Villagómez, G. (1997). Solid substrate anaerobic co-digestion of paper mill sludge, biosolids, and municipal solid waste. *Water Science and Technology*, *35*(2–3), 197 LP-204. Retrieved from <http://wst.iwaponline.com/content/35/2-3/197.abstract>
- Quéméneur, M., Hamelin, J., Barakat, A., Steyer, J. P., Carre, H., & Trably, E. (2012). Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, *37*(4), 3150–3159. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.033>
- Rai, P. K., Singh, S. P., Asthana, R. K., & Singh, S. (2014). Biohydrogen production from sugarcane bagasse by integrating dark- and photo-fermentation, *152*, 140–146.
- Raposo, F., Borja, R., Martín, M. A., Martín, A., de la Rubia, M. A., & Rincón, B. (2009). Influence of inoculum-substrate ratio on the anaerobic digestion of sunflower oil cake in batch mode: Process stability and kinetic evaluation. *Chemical Engineering Journal*, *149*(1–3), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.10.001>
- Razaghi, A., Karthikeyan, O. P., Nguyen Hao, H. ., & Heinamm, K. (2016). Hydrolysis treatments of fruit and vegetable waste for production of biofuel precursors. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, *217*, 100–103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.041>
- REMBIO. (2011). LA BIOENERGÍA EN MÉXICO Situación actual y perspectivas de

Bioenergía. *Cuaderno Temático Sobre La Bioenergía*, 4, 44.

- Ren, N., Guo, W., Liu, B., Cao, G., & Ding, J. (2011). Biological hydrogen production by dark fermentation: Challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.022>
- Rodríguez Cordero, A. A., Briseño Zamarripa, D. M., Escamilla Alvarado, C., & Rivas-García, P. (2017). ESTRATEGIAS DE PRODUCCIÓN DE BIOMETANO A PARTIR DE UNA MEZCLA TÍPICA DE RESIDUOS ORGÁNICOS DE LA ZONA METROPOLITANA DE MONTERREY.
- Rolly, R., Sivagurunathan, P., Parthiban, A., & Kim, S. (2016). Optimization of substrate concentration of dilute acid hydrolyzate of lignocellulosic biomass in batch hydrogen production, 113, 22–27.
- Rueda Abad, J. C., Gay García, C., & Solórzano Quintana, F. (2016). *21 visiones de la COP21. Universidad Nacional Autónoma de México*.
- SAGARPA. (2013). Agenda de Innovación Agroindustrial, (Ejercicio).
- Sagnak, R., & Kargi, F. (2011). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of acid hydrolyzed wheat starch with periodic feeding. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(7), 4348–4353. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.033>
- Sagnak, R., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2011). Bio-hydrogen production from acid hydrolyzed waste ground wheat by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(20), 12803–12809. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.07.076>
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2008). Lime pretreatment , enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol, 32, 971–977. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.01.014>
- Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales : Pasado , Presente y Futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14–46.
- Sawatdeenarunat, C., Nguyen, D., Surendra, K. C., Shrestha, S., Rajendran, K., Oechsner, H., ... Kumar, S. (2016). Bioresource Technology Anaerobic biorefinery: Current status , challenges , and opportunities. *BIORESOURCETECHNOLOGY*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.074>
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10), 786–794. <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- SENER. (2015). *Prospectiva de Energías Renovables 2015 - 2029*. Retrieved from [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44324/Prospectiva\\_Energ\\_as\\_Renovables\\_2015\\_-\\_2029\\_VF\\_22.12.15.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/44324/Prospectiva_Energ_as_Renovables_2015_-_2029_VF_22.12.15.pdf)
- Sermanat. (2015). *Programa estatal de gestión de residuos de Nuevo León 2009-2015*. Monterrey.
- Shi, J., Xu, F., Wang, Z., Stiverson, J. A., Yu, Z., & Li, Y. (2014). Effects of microbial and non-microbial factors of liquid anaerobic digestion effluent as inoculum on solid-state anaerobic digestion of corn stover. *Bioresourcetechology*, 157, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.089>
- Shi, X. Y., & Yu, H. Q. (2005). Response surface analysis on the effect of cell concentration and light intensity on hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulata*. *Process Biochemistry*, 40(7), 2475–2481. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.09.010>



- Silalertruksa, T., Pongpat, P., & Gheewala, S. H. (2016). Life cycle assessment for enhancing environmental sustainability of sugarcane biorefinery in Thailand. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.010>
- Singh, D. P., & Trivedi, R. K. (2013). Acid And Alkaline Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass To Produce Ethanol As Biofuel. *International Journal of ChemTech Research*, 5(2), 727–734.
- Slimane, K., Fathya, S., Assia, K., & Hamza, M. (2014). Influence of inoculum/substrate ratios (ISRs) on the mesophilic anaerobic digestion of slaughterhouse waste in batch mode: Process stability and biogas production. *Energy Procedia*, 50, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.007>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2010). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, (June). <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Sol, M., & Lansing, S. (2013). Characterizing food waste substrates for co-digestion through biochemical methane potential (BMP) experiments. *Waste Management*, 33(12), 2664–2669. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.09.004>
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., & Cen, K. (2009). Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(21), 8846–8853. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.09.001>
- Svanström, M. (2015). Allocation in LCAs of biorefinery products: implications for results and, 93, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.013>
- Tampio, E., Ervasti, S., Paavola, T., Heaven, S., Banks, C., & Rintala, J. (2014). Anaerobic digestion of autoclaved and untreated food waste. *Waste Management*, 34(2), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.10.024>
- Tao, Y., Chen, Y., Wu, Y., He, Y., & Zhou, Z. (2007). High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.034>
- Thulluri, C., Goluguri, B. R., Konakalla, R., Reddy Shetty, P., & Addepally, U. (2013). The effect of assorted pretreatments on cellulose of selected vegetable waste and enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 49, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.022>
- Tobert, D. R., & Curtis, S. (2013). ILCD Handbook. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Torres Lozada, P., & Pérez, A. (2010). Actividad metanogénica específica: Una herramienta de control y optimización de sistemas de tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Ingeniería de Recursos Naturales Y Del Ambiente*, 5–14.
- Uçkun, E., Trzcinski, A. P., Jern, W., & Liu, Y. (2014). Bioconversion of food waste to energy: A review, 134, 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.074>
- Urbaniec, K., & Bakker, R. R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation - A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(9), 3648–3658. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.073>
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.034>
- VALORGAS. (2011). Compositional analysis of food waste from study sites in geographically distinct regions of Europe, 1–8.

- Vazquez, R. V. (2008). *Enhanced Stabilisation of Municipal Solid Waste in bioreactor landfills*. <https://doi.org/10.1201/9781439828373>
- Venkata Mohan, S., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M. V., Kumar, A. N., & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. *Bioresource Technology*, 215(March), 2–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.130>
- Wang, J., & Wan, W. (2008). Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20), 5392–5397. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.010>
- Wang, J., & Wan, W. (2009). Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3313–3323. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.02.031>
- Wang, Z., Xu, F., & Li, Y. (2013). Effects of total ammonia nitrogen concentration on solid-state anaerobic digestion of corn stover. *Bioresource Technology*, 144, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.106>
- Weaver, P. F., Wall, J. D., & Gest, H. (1975). Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Archives of Microbiology*, 105(3), 207–216. <https://doi.org/10.1007/BF00447139>
- Xia, A., Cheng, J., Lin, R., Liu, J., Zhou, J., & Cen, K. (2013). Sequential generation of hydrogen and methane from glutamic acid through combined photo-fermentation and methanogenesis. *Bioresource Technology*, 131, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.009>
- Xia, A., Cheng, J., Lin, R., Lu, H., Zhou, J., & Cen, K. (2013). Comparison in dark hydrogen fermentation followed by photo hydrogen fermentation and methanogenesis between protein and carbohydrate compositions in *Nannochloropsis oceanica* biomass. *Bioresource Technology*, 138, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.171>
- Zagrodnik, R., & Laniecki, M. (2015). The role of pH control on biohydrogen production by single stage hybrid dark- and photo-fermentation. *Bioresource Technology*, 194, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.028>
- Zambrano Arévalo, A. M. (2015). Aproximación conceptual al análisis térmico y sus principales aplicaciones. *Universidad Nacional de Colombia*, 1–92. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/50615/>
- Zeng, S., Yuan, X., Shi, X., & Qiu, Y. (2010). Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Microcystis* spp. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1–3), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.047>
- Zhang, K., Ren, N. Q., & Wang, A. J. (2015). Fermentative hydrogen production from corn stover hydrolyzate by two typical seed sludges: Effect of temperature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(10), 3838–3848. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.01.120>
- Zhang, Q., Hu, J., & Lee, D.-J. (2016). Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renewable Energy*, 98, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.029>
- Zhang, Y., Fu, X., & Chen, H. (2012). Pretreatment based on two-step steam explosion combined with an intermediate separation of fiber cells-Optimization of fermentation of corn straw hydrolysates. *Bioresource Technology*, 121, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.006>
- Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7), 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zheng, Y., Lee, C., Yu, C., Cheng, Y. S., Zhang, R., Jenkins, B. M., & VanderGheynst, J. S. (2013). Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied*

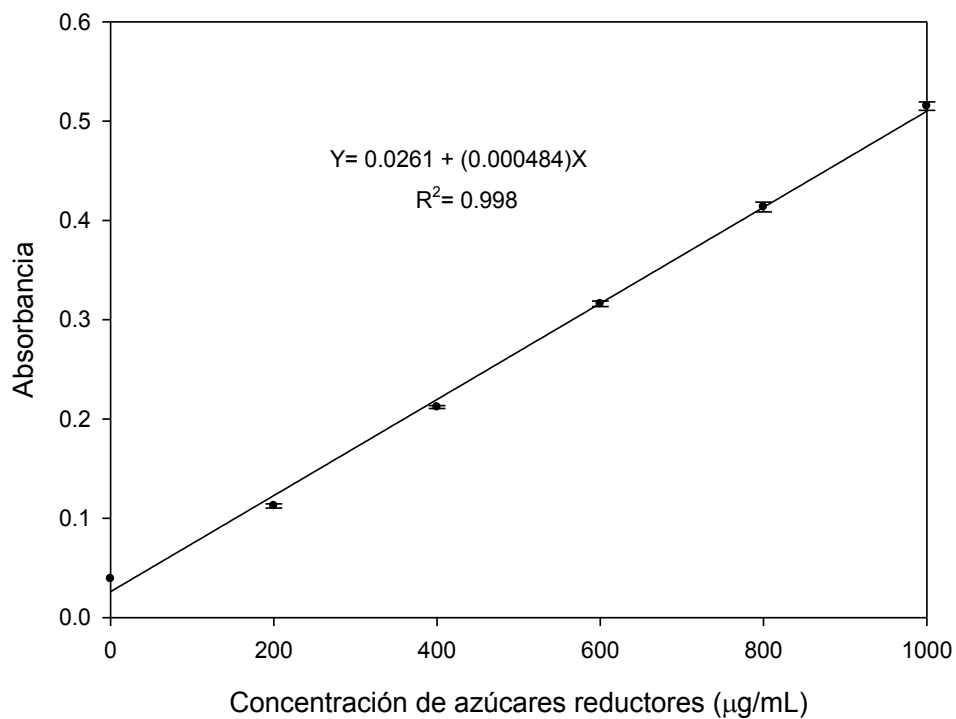
- Energy*, 105, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.11.070>
- Zhu, J., Wan, C., & Li, Y. (2010). Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 101(19), 7523–7528. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.060>
- Zhu, Z., Shi, J., Zhou, Z., Hu, F., & Bao, J. (2010). Photo-fermentation of *Rhodobacter sphaeroides* for hydrogen production using lignocellulose-derived organic acids. *Process Biochemistry*, 45(12), 1894–1898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.017>
- Zinatizadeh, A. A., Mirghorayshi, M., Birgani, P. M., Mohammadi, P., & Ibrahim, S. (2017). Influence of thermal and chemical pretreatment on structural stability of granular sludge for high-rate hydrogen production in an UASB bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.029>
- Zu, S., Li, W. zhi, Zhang, M., Li, Z., Wang, Z., Jameel, H., & Chang, H. min. (2014). Pretreatment of corn stover for sugar production using dilute hydrochloric acid followed by lime. *Bioresource Technology*, 152, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.034>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x>
- Zyi, C. Van, Prior, B. A., & Preez, J. C. (1991). Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*.

## ANEXOS

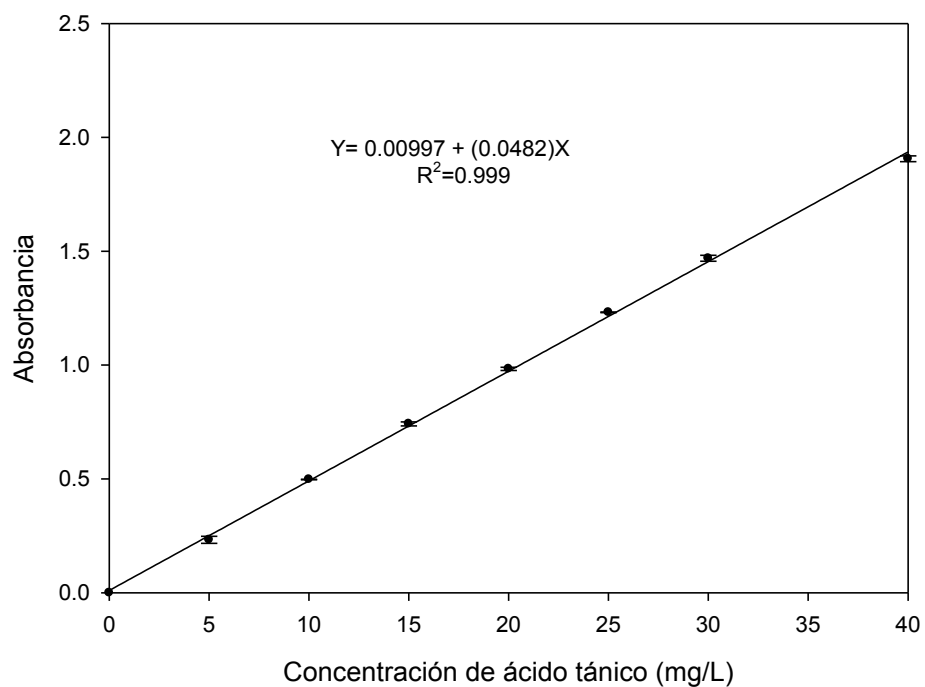


**ANEXO A.** Co-sustratos: RM y RVF.

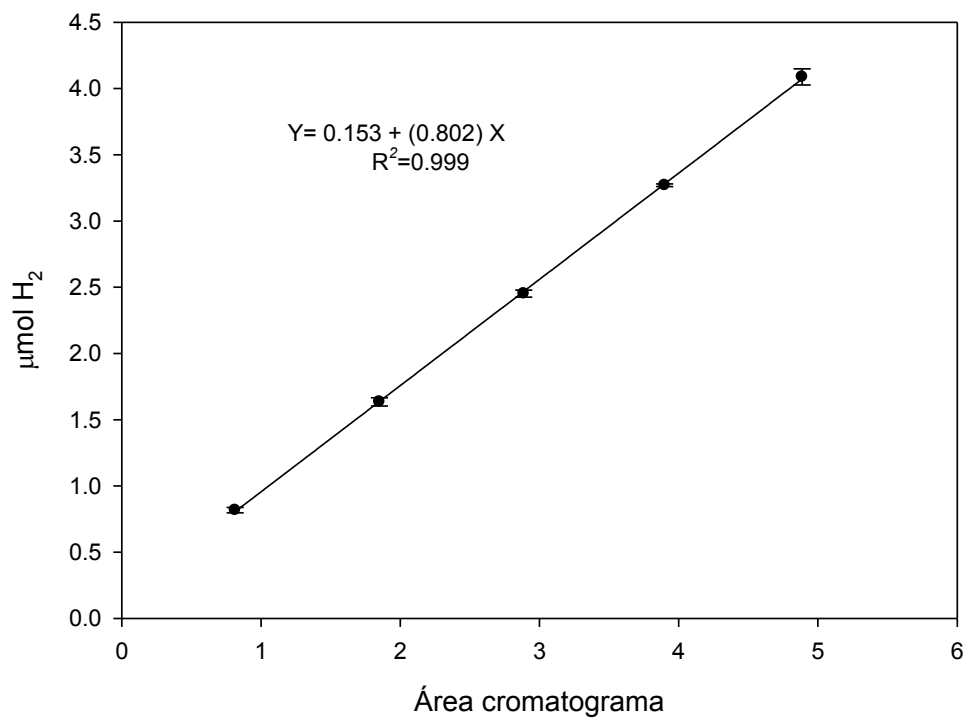
**ANEXO B.** Curva de calibración de azúcares reductores (Estándar: dextrosa anhidra 0.1%).



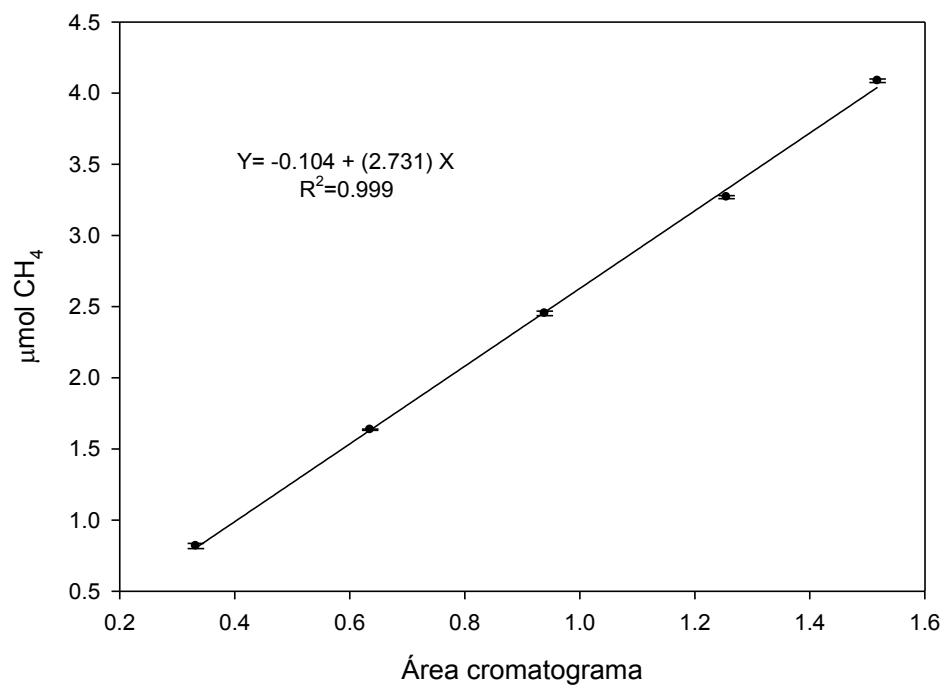
**ANEXO C.** Curva de calibración compuestos fenólicos totales (Estándar: ácido tánico)



**ANEXO D.** Curva de calibración de hidrógeno por cromatografía de gases,



**ANEXO E.** Curva de calibración de metano por cromatografía.



**ANEXO F.** Tabla ANOVA del diseño de experimento de hidrólisis ácida, efecto de la combinación de RVF:RM y el tipo de ácido en los azúcares reductores.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gados de libertad</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	457.16	9	50.79	14.22	< 0.0001
A-Combinación(RVF:RM)	211.34	4	52.84	14.79	< 0.0001
B-Tipo de ácido	173.76	1	173.76	48.64	< 0.0001
AB	72.05	4	18.01	5.04	0.0056
Error	71.45	20	3.57		
Total	528.61	29			

**ANEXO G.** Tabla ANOVA del diseño de experimento de hidrólisis ácida, efecto de la conversión de en azúcares reductores.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gados de libertad</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	15087.18	9	1676.35	52.19	< 0.0001
A-Combinación(RVF:RM)	11629.61	4	2907.40	90.52	< 0.0001
B-Tipo de ácido	2353.51	1	2353.51	73.27	< 0.0001
AB	1104.07	4	276.02	8.59	0.0003
Error	642.40	20	32.12		
Total	15729.59	29			

**Anexo H.** Parámetros de la ecuación de Gompertz para cada duplicado del diseño de experimentos  $3^2$  de FO. (Concentración de azúcares reductores iniciales-RIS-número del experimento)

<b>Experimento</b>	<b>Hmax</b>	<b>Rmax</b>	<b><math>\lambda</math></b>	<b><math>R^2</math></b>
10-1.2-1	5.36	0.17	15.28	0.99
10-1.2-2	7.30	0.26	16.18	0.99
13-1.2-1	8.33	0.36	15.15	0.99
13-1.2-2	7.82	0.33	15.86	0.99
16-1.2-1	6.37	0.19	17.62	0.99
16-1.2-2	8.78	0.29	17.05	0.99
10-1.0-1	6.84	0.23	14.66	0.99
10-1.0-2	7.02	0.25	16.57	0.99
13-1.0-1	7.52	0.20	17.42	0.99
13-1.0-2	7.88	0.28	16.00	0.99
16-1.0-1	7.46	0.29	18.43	0.99
16-1.0-2	8.02	0.29	16.76	0.99
10-0.8-1	7.52	0.25	16.58	0.99
10-0.8-2	7.84	0.31	16.64	0.99
13-0.8-1	8.34	0.33	16.36	0.99
13-0.8-2	5.63	0.21	28.11	0.99
16-0.8-1	6.52	0.16	24.99	0.99
16-0.8-2	7.91	0.42	23.68	0.99